

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Katedra biochemie



**Bc. Jakub Benýšek**

**Příprava slepičích protilátek proti  
fosfoserinovým zbytkům  
fosfoproteinů**

**Preparation of chicken antibodies against  
phosphoserine residues of phosphoproteins**

**(Diplomová práce)**

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Marie Tichá, CSc.

Konzultant diplomové práce: Ing. Zdenka Kučerová, CSc.

**Praha, 2012**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl veškeré použité zdroje, které jsem řádně ocitoval

V Praze dne .....

.....Jakub Benýšek

V první řadě bych rád poděkoval Prof. RNDr. Marii Tiché, CSc. za trpělivost, ochotu a odborné připomínky, bez kterých by tato práce nevznikla. Doc. RNDr. Petrovi Hodkovi, CSc. za přípravu a izolaci slepičích protilátek a poskytnutí praktických rad. Dále bych poděkoval Ing. Zdeně Kučerové, CSc. za možnost vypracování diplomové práce na Ústavu patologické fyziologie 1. lékařské fakulty UK v Praze.

Taktéž děkuji Mgr. Michaele Rajčanové, RNDr. Janě Frýdlové, Ph.D, Haně Muselové za odborné rady a příjemné pracovní podmínky. Děkuji RNDr. Petru Přikrylovi za poskytnutá data z hmotnostní spektrometrie. Petru Přikrylovi za poskytnutá data z hmotnostní spektrometrie.

## **Abstrakt**

Byl připraven nový typ imunogenu pro přípravu slepičích protilátek specifických pro O-fosforylované aminokyselinové zbytky fosfoproteinů: směs fosfopeptidů  $\alpha$ -kaseinu imobilizovaná na maleylovaný derivát hovězího serového albuminu. Pro separaci fosfopeptidů  $\alpha$ -kaseinu ze směsi peptidů po štěpení proteinu trypsinem byla použita afinitní chromatografie na imobilizovaných železitých iontech (Fe(III)-IDA-Sepharosa). Separovaná frakce fosfopeptidů  $\alpha$ -kaseinu byla navázána na maleylovaný derivát hovězího sérového albuminu. Přítomnost navázaných fosfopeptidů byla prokázána pomocí MALDI-TOF MS analýzy. Po imunizaci slepic připraveným imunogenem, byla ze žloutků izolována imunoglobulinová frakce, která dále byla purifikována pomocí afinitní chromatografie na  $\alpha$ -kasein-Sepharose a na hovězím sérovém albuminu imobilizovaném na Sepharose (BSA-Sepharosa). Specifita získaných protilátek byla testována pomocí ELISA testů. Bylo zjištěno, že připravené slepičí protilátky, ani jejich frakce po afinitní chromatografii na  $\alpha$ -kasein-Sepharose O-fosforyl-O-serinový zbytek v modelových fosfoproteinech ( $\alpha$ -kasein, fosvitin, ovalbumin) nerozpoznávají. Pomocí synteticky připravených antigenů bylo prokázáno, že slepičí protilátky připravené imunizací antigenem vázaným na maleylovaný nosný protein rozpoznávají přítomnost maleinylového řetězce vázaného na molekule proteinu.

## **Abstract**

New type of immunogen for the preparation of chicken antibodies specific for O-phosphorylated amino acid residues of phosphoproteins was prepared: the  $\alpha$ -casein phosphopeptide mixture was coupled to maleinylated derivative of bovine serum albumin. Affinity chromatography on immobilized Fe(III) ions (Fe(III)-IDA-Sepharose) was used for the separation of the  $\alpha$ -casein phosphopeptide fraction from the  $\alpha$ -casein peptide mixture obtained by the proteolytic digestion using trypsin. The presence of the coupled phosphopeptide fraction was shown by means of MALDI-TOF MS analysis. After chicken immunisation with the prepared immunogen the immunoglobulin fraction was isolated from egg yolks that was further purified using affinity chromatography on  $\alpha$ -casein-Sepharose and bovine serum albumin immobilized on Sepharose (BSA-Sepharose). The specificity of obtained immunoglobulin fractions was tested by means of ELISA tests. The obtained results showed, that the prepared chicken antibodies and their fractions obtained by affinity chromatography on  $\alpha$ -casein-Sepharose do not recognize the O-phosphoryl-L-serine residues of phosphoproteins ( $\alpha$ -casein, phosvitin, ovalbumin). Using the prepared different antigens it has been shown, that prepared chicken antibodies interact with maleinylated chain coupled to carrier proteins used for chicken immunisation. (In Czech)

## **Seznam použitých zkratek**

BSA	hovězí sérový albumin
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FOS	fosvitin
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
KLH	Keyhole Lympet Hemocyanin
MA-BSA	maleylovaný hovězí sérový albumin
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
MES	2-( <i>N</i> -morpholino)ethanesulfonová kyselina
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimid
OVA	ovalbumin
P-threonin	fosforyl-O-L-thronin
P-serin	fosforyl-O-L-serin
P-tyrosin	fosforyl-O-L-tyrosin
RIA	radio Immuno Assay
TFA	kyselina trifluoroctová
TBS	tris-buffered saline

# **Obsah:**

Seznam použitých zkratk	3
1. Teoretická část	6
1.1. Úvod	6
1.2. Fosforylace proteinů	7
1.3. Fosfoproteomika	8
1.4. Metody studia fosfoproteinů	8
1.4.1. Detekce fosfoproteinů po elektroforetické separaci	8
1.4.2. Techniky pro selektivní obohacení fosfoproteinů/fosfopeptidů	10
1.4.3. Fosfo-specifické protilátky	14
1.5. Slepíčí protilátky	16
1.5.1. Imunoglobuliny u ptáků	16
1.5.2. Purifikace slepičích protilátek	17
1.5.3. Aplikace slepičích protilátek	18
1.5.4. Fosfospecifické slepičí protilátky	18
2. Cíl práce	20
3. Materiál a metody	21
3.1. Použitý materiál a chemikálie	21
3.1.1. Chemikálie	21
3.1.2. Slepíčí protilátky	21
3.2. Použité přístroje	22
3.3. Příprava imunogenu	22
3.3.1. Příprava fosfopeptidů $\alpha$ -kaseinu	22
3.3.2. Separace fosfopeptidů $\alpha$ -kaseinu	23
3.3.3. Konjugace fosfopeptidů $\alpha$ -kaseinu pomocí karbodiimidové reakce	23
3.4. Separace imunoglobulinové frakce z roztoku žloutku	24
3.5. Afinitiní chromatografie slepičích protilátek na Sepharose s imobilizovaným $\alpha$ -kaseinem	24
3.5.1. Imobilizace $\alpha$ -kaseinu na CNBr- Sepharosu	24
3.5.2. Purifikace slepičích protilátek na Sepharose s imobilizovaným $\alpha$ -kaseinem	25
3.6. Afinitiní chromatografie slepičích protilátek na Sepharose s imobilizovaným BSA	26
3.6.1. Stanovení koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích slepičích protilátek	26
3.7. ELISA test - zhodnocení specifity separovaných slepičích protilátek	27
3.7.1. Příprava syntetických antigenů (fosforyl-O-L-seryl-BSA a maleyl-myoglobin)	27
3.7.2. Provedení ELISA testu s protilátkou značenou alkalickou fosfatase	28
3.8. MALDI-TOF analýza	30
4. Výsledky	31
4.1. Příprava slepičích protilátek proti O-fosforylovaným aminokyselinovým zbytkům fosfoproteinů	31
4.1.1. Příprava imunogenu pro imunizaci slepic	31
4.1.2. Příprava modifikovaných derivátů proteinů pro zjišťování jejich specifity	34
4.1.3. Separace imunoglobulinové frakce ze žloutků	36
4.1.4. Ověření specifity získaných frakcí protilátek	37

4.2.	Purifikace slepičích protilátek.....	41
4.2.1.	Imobilizace $\alpha$ -kaseinu na CNBr-aktivovanou Sepharosu.....	41
4.2.2.	Afinitní purifikace slepičích protilátek na sloupci Sepharosy s imobilizovaným hovězím sérovým albuminem .....	45
5.	Diskuse.....	52
6.	Závěr .....	56
7.	Seznam použité literatury: .....	57



# **1. Teoretická část**

## **1.1. Úvod**

Je známo více jak 200 posttranslačních modifikací, z nichž jen část je reverzibilní a důležitá pro regulaci biologických pochodů. V současné době je nejvíce studována fosforylace proteinů, která byla poprvé popsána v roce 1955 Krebsem a Fisherem [1] a Sutherlandem a Wosilaitem [2], kteří objasnili její důležitou úlohu při přeměně inaktivní formy glykogen fosforylasy na aktivní enzym. Fosforylace proteinů je reverzibilní proces, který může modulovat funkční vlastnosti proteinů tím, že způsobuje změnu jejich konformace, která ovlivňuje stabilitu a aktivitu [3, 4] nebo umožní jejich interakci s jinými proteiny [5].

Ačkoliv část fosfoproteinů zůstává fosforylována a stupeň fosforylace se výrazně nemění, daleko větší část proteinů vykazuje fosforylaci reverzibilní. Jedná se převážně o proteiny účastnící se signálních kaskád. Tento dynamický, reverzibilní charakter vzniká díky působení dvou tříd enzymů. Fosforylaci resp. vnesení fosfátové skupiny zajišťuje třída enzymů zvaných protein kinasy. Defosforylaci naopak třída enzymů nazvaná fosfatasy. Systém fosforylace-defosforylace proteinů buňka využívá například při šíření buněčného signálu, buněčné proliferaci, regulaci metabolismu, imunologické odpovědi, transportu proteinů, šíření nervového vzruchu, degradace proteinů, podílí se na udržení buněčné integrity a apoptosy. Poruchy v reverzibilní fosforylaci proteinů mohou mít souvislost s vážnými onemocněními (např. rakovina, diabetes melitus či Alzheimerova choroba [6]. Z tohoto důvodu pochopení signálních kaskád a rozpoznání fosforylačních míst na proteinech resp. peptidech patří v současné době mezi rychle se rozvíjející vědní obor, který je označován jako fosfoproteomika [7, 8].

## 1.2. Fosforylace proteinů

Současné studie poukazují na fakt, že lidský genom obsahuje asi 2-3% genů kódujících protein kinázy a fosfatázy a více jak 1000 proteinfofosfatas bylo za pomoci genetických metod předpovězeno. Předpokládá se, že více jak jedna třetina proteinů v eukaryotické buňce je fosforylována. Doposud byly popsány čtyři typy vazeb fosfátové skupiny k aminokyselinovým zbytkům vázaných v peptidovém řetězci. Jedná se o O-fosforylaci, N-fosforylaci, acylfosforylaci a S-fosforylaci. Z výše vyjmenovaných je u eukaryotických organismů nejčastější O-fosforylace. V tomto případě dochází k vazbě fosfátové skupiny na serinové, threoninové nebo tyrosinové zbytky. Tyto aminokyseliny ovšem nejsou modifikovány stejnou měrou, nejčastěji jsou fosforylovány zbytky serinu a threoninu; procentuální poměr je přibližně 90 % serinových zbytků, 9,95 % threoninových zbytků a pouze 0,05% tyrosinových zbytků. V případě N-fosforylace jsou akceptory histidinové a lysinové zbytky. Pro S-fosforylaci je charakteristická vazba na cysteinové zbytky a konečně pro acyl-fosforylaci na zbytky kyseliny glutamové a kyseliny asparťové [9, 10, 11].

Jednotlivé fosforylované aminokyseliny se liší svou chemickou stabilitou což má vliv na jejich separaci, analýzu nebo detekci. Všechny O-fosfáty jsou stabilní v kyselém prostředí, proto je možné detekovat fosforylovaný serin i threonin po kyselé hydrolýze proteinu. Fosfotyrosin je stabilní i v alkalickém prostředí. N-fosfáty s výjimkou fosfoargininu jsou relativně stabilní v alkalickém prostředí, ale extrémně labilní v kyselém prostředí. Fosfocystein je nestabilní v kyselém prostředí, ale relativně stabilní v alkalickém prostředí [12, 13].

Donorem fosfátové skupiny při fosforylaci proteinů je ATP či GTP. Reakce je katalyzována skupinou enzymů pojmenovaných jako proteinkinasy. Dělí se dle substrátové specifity na dvě skupiny. Ser/Thr-proteinkinázy používají jako substrát hydroxylovou skupinu serinových a threoninových zbytků, Tyr-proteinkinasy modifikují tyrosinové zbytky. Proteinkinasy s duální specifitou působí jako serin/threonin-proteinkinasy a zároveň i jako tyrosin-proteinkinasy [14, 15, 16].

## 1.3. Fosfoproteomika

Fosfoproteomika tvoří součást proteomiky. Zabývá se identifikací a charakterizací proteinů posttranslačně modifikovaných fosforylací. Jejím hlavním úkolem je identifikace fosfoproteinů resp. fosfopeptidů, určením místa fosforylace a kvantifikace fosforylace. Navzdory důležité roli, kterou v organismu bezesporu fosfoproteiny hrají, jsou v buňce zastoupeny v daleko menší míře než proteiny bez této posttranslační modifikace. Zatímco některé proteiny jsou fosforylovány permanentně, jiné jsou pouze přechodně na velmi krátkou dobu díky působení přítomných proteinfosfatas. Nicméně nízká četnost fosfoproteinů v buňce, rychle se měnící poměr fosforylovaných ku nefosorylovaným proteinům a možnost fosforylace proteinu na více místech klade vysoké nároky na analytické metody používané k jejich detekci a identifikaci [9, 17].

## 1.4. Metody studia fosfoproteinů

### 1.4.1. Detekce fosfoproteinů po elektroforetické separaci

#### 1) Izotopické značení fosfoproteinů

Detekce za pomoci izotopově značeného fosforu  $^{32}\text{P}$  či  $^{33}\text{P}$  patří mezi nejstarší metody. Buňky se nechají nejprve inkubovat se značeným  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ . Po metabolickém značení a následném oddělení proteinové frakce, je provedena elektroforetická separace a značené proteiny jsou radiograficky vyhodnoceny [18].

#### 2) Detekce fosfoproteinů pomocí fluorescenčních barviv

Novou alternativou k radiografické detekci je použití fluorescenčních barviv, specifických na detekci fosfoskupiny, modifikující zbytky tyrosinu, serinu či threoninu. Jedním z nich je například Pro-Q<sup>®</sup> Diamond [19, 20].

#### 3) Detekce fosfoproteinů při použití fosfatasy

Fosforylace proteinu má za následek změnu celkového náboje proteinu a tím dojde i ke změně migrace při 2D-elektroforese; obdobně i v případě defosforylace

fosfoproteinů pomocí fosfatázy. Přítomnost fosfoproteinů je pak detekována pomocí porovnání výsledků elektroforézy získané v přítomnosti a nepřítomnosti fosfatasy [21].

#### **4) Detekce pomocí specifických protilátek**

Imunodetekce (Western blotting) je již delší dobu známá a široce využívaná technika [22] pro specifickou detekci proteinů separovaných buď 1D nebo 2D polyakrylamidovou elektroforézou [23, 24] a přenesených na nitrocelulosovou membránu. Úspěch tohoto typu detekce fosfoproteinů závisí na selektivitě a afinitních charakteristikách použitých protilátek. (viz. kapitola 1.4.3). Protože výskyt falešně pozitivních detekcí snižuje možnost obecné aplikace této techniky. Stejně jako v případě imunoprecipitace jako nástroje pro selektivní separaci fosfopeptidů (kapitola 1.4.2.4), byly pro imunodetekci úspěšně používány dostupné anti-P-tyrosin specifické protilátky ((PY) 20, PY 100 a 4G10) [9].

Aplikace anti-P-serin a anti-P-threonin specifických protilátek má určitá omezení. Srovnání specifity a spolehlivosti těchto dvou protilátek bylo popsáno Grønborgem et al. [25]. Anti-P-tyrosin a anti-P-serin protilátky a imunoblotting byly např. použity k analýze signálních transdukčních kaskád [26] nebo ke studiu fosforylace proteinu CPI-17 z hladkého svalu [27]

Pro detekci fosfopeptidů před analýzou hmotnostní spektrometrií byla popsána jednoduchá metoda využívající protilátky specifické pro fosfoaminokyseliny: tečkovací reakce na nitrocelulosové membráně („immuno-dot blot“). Směs izolovaných a obohacených fosfopeptidů je nanášena na membránu z nitrocelulosy, membrána je blokována roztokem BSA a následně je nanášena primární fosfospecifická protilátka. K vyvolání je poté použita sekundární protilátka značená křenuvou peroxidázou. Ovšem i tato metoda je limitována dostupností kvalitních fosfospecifických protilátek, které jsou v současné době velmi drahé a co se týče anti P-serin/P-threonin protilátek i málo specifické [28]

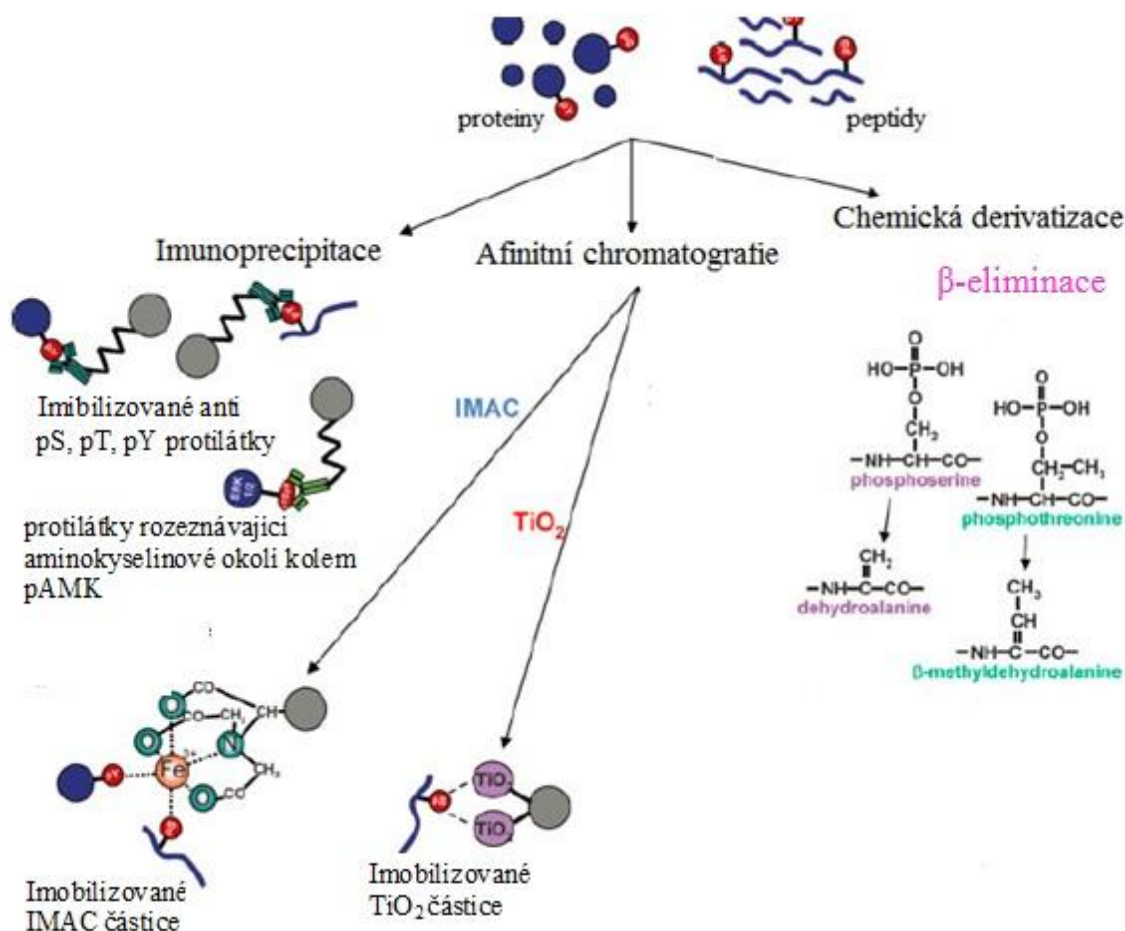
Ačkoliv imunodetekce fosfoproteinů na nitrocelulosové membráně po elektroforetické separaci umožňuje detekci fosfoproteinů vyskytujících se v malém množství, není tato metoda vhodná pro kvantitativní analýzu pro nestejnou schopnost proteinů se adsorbovat na membránu.

Monoklonální anti-P-tyrosin specifická protilátka fluorescenčně značená byla použita k vypracování metody pro monitorování změn fosforylace tyrosinových zbytků v buňce založená na „microarray assay“ (angl.) [29].

### 1.4.2. Techniky pro selektivní obohacení fosfoproteinů/fosfopeptidů

Přestože byla popsána řada metod, umožňujících detekci přítomnosti fosfoproteinů v celkových buněčných lyzátech, má tento přístup řadu omezení, které souvisí hlavně s výskytem malého množství modifikovaných proteinů a také s možností výskytu různě fosforylovaných forem jednoho proteinu. Z tohoto důvodu v současné době používané postupy zahrnují jako první krok separaci, která má za cíl tzv. obohacení (angl. enrichment) fosfoproteinů nebo po proteolytickém štěpení fosfopeptidů. Techniky obohacování lze rozdělit do několika skupin: (obr. 1 na následující straně) [17].

- metody založené na interakci fosfátové skupiny s imobilisovanými ionty kovů  
 $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ti}^{4+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Zr}^{4+}$
- separace využívající interakci fosfopeptidů s oxidy kovů  
 $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$
- metody využívající chemické modifikace fosfátové skupiny  
selektivní modifikace fosfoaminokyselinových zbytků, umožňující snadnější izolaci a identifikaci
- metody využívající specifických protilátek:  
proti fosforylovaným aminokyselinám, výhodou je zde vysoká citlivost a v případě vhodné protilátky i vysoká specifita



**Obr. 1**

**Metody užívané ve fosfoproteomice k obohacení fosfoproteinů resp. fosfopeptidů.**

pS: fosfoserin, pT: fosfoserin, pY: fosfotyrosin, pAMK: fosforylovaná aminokyselina.

Převzato a upraveno z [17]

#### **1.4.2.1. Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (IMAC)**

Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech byla poprvé popsána v roce 1975 Porathem et al. [30].  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  ionty byly imobilizovány za pomoci kyseliny iminodioctové na Sepharosový nosič. Ionty byly použity k separaci proteinů z lidského séra. Další publikace těchto autorů z roku 1986 již popisuje  $\text{Fe}^{3+}$  ionty imobilizované na Sepharosu, obsahující vázanou iminodioctovou kyselinu (IDA), ukázalo se, že tento afinitní nosič je výhodným nástrojem pro separaci jako výhodný afinitní nosič pro separaci různě fosforylovaných forem ovalbuminu [31]. Kromě

kyseliny iminodioctové, která tvoří s iontem kovu tři koordinační vazby se dále komerčně využívá karboxymethylovaná aspartátová kyselina (CM-ASp) [32] nebo kyselina nitrilotrioctová [33] se čtyřmi koordinačními vazbami. Obdobně je v publikacích popsáno použití i jiných kovů než železa např.  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Zr}^{4+}$ ,  $\text{Ti}^{4+}$  [34, 35, 36]. Výsledky ukazují, že galitý ion přednostně váže peptidy s jednou fosfátovou skupinou, železitý ion váže spíše peptidy obsahující dvě či tři fosfátové skupiny a konečně titaničitý a zirkoničitý váže více fosfátových skupin [34, 37, 38].

Nevýhodou této metody ovšem zůstává fakt, že dochází též k vazbě nefosforylovaných peptidů prostřednictvím karboxylové skupiny postranního řetězce kyselin asparagové a glutamové. Odstranění tohoto problému je možné úpravou pH, změnou iontové síly pufru nebo esterifikací karboxylových skupin postranních řetězců aminokyselinových zbytků, nejčastěji na O-methyl derivát. [7, 39].

V současné době je věnováno velké úsilí přípravě nových materiálů sloužících jako nosič např. magnetické mikro či nanočástice. Jsou tvořeny z magnetického jádra ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) a dalších složek [40] jako např. z P(HEMA-*co*-GMA), což je zkratka pro (2-hydroxyethyl metakrylát-*co*-glycidyl metakrylát). Takto vzniklé neporézní a hydrofilní mikročástice jsou modifikovány iminodioctovou kyselinou, která váže  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  či  $\text{Ga}^{3+}$ . Tím odpadá časová náročnost potřebná k centrifugaci těchto částic, rozptýlených v roztoku a pouhým vložením vnějšího magnetického pole dojde k jejich separaci s navázanými fosfopeptidy od ostatních látek přítomných v roztoku [41, 42].

#### **1.4.2.2. Separace využívající interakci s oxidy kovů**

Separace využívající interakci fosfopeptidů s některými oxidy kovů představuje alternativní metodu pro jejich obohacení z komplexních biologických směsí. Využívá kolony plněné přímo oxidy vybraných kovů. Schopnost oxidu titaničitého selektivně adsorbovat organické fosfáty byla popsána už v roce 1990 [43], ale teprve později byl tento nosič použit pro separaci fosforylovaných peptidů [44, 45]. Spolu s fosfopeptidy mohou být na  $\text{TiO}_2$  adsorbovány i nefosforylované peptidy a jejich adsorpci lze omezit esterifikací jejich karboxylových skupin [44, 46] nebo použitím kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové, ftalové nebo salicylové při adsorpci [47].

Pro izolaci fosfopeptidů z proteolyticky štěpených proteinů byl použit i  $\text{ZrO}_2$  [48, 49],  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  [50],  $\text{Al}_2\text{O}_3$  [51] a  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  [52].

#### 1.4.2.3. Metody využívající chemické modifikace fosfátové skupiny

Jiný přístup identifikace a purifikace fosfopeptidů nabízí techniky, které selektivně chemickými činidly modifikují fosfátovou skupinu pro snadnější separaci modifikovaných peptidů a jejich analýzu. Jednou z metod je  $\beta$ -eliminace fosfátové skupiny a následná adice ethylthiolu (ethylmerkaptanu). Fosforylované tyrosinové zbytky tímto způsobem nejsou modifikovány [53, 54]. Popsaný postup byl modifikován, aby umožnil specifickou izolaci původně fosforylovaných peptidů: fosforylované aminokyselinové zbytky byly substituovány derivátem biotinu a separovány pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaném avidinu [55].

Jiná skupina pracovníků využila rovněž  $\beta$ -eliminační reakce v kyselém prostředí, kdy ze serinu a threoninu vznikne dehydroalanin (2-aminoakrylová kyselina) a kyselina dehydromáselná. Jejich případné fosfátové skupiny posléze reagují s volnou thiolovou skupinou na 6-(2-merkapt-acetylamin)-amidu kyseliny hexanové, který je imobilizován k syntetické pryskyřici [56].

Další popsaná metoda, která úspěšně napomohla určit řadu fosforylačních míst u kvasinky *S. cerevisce* je obecně použitelná i pro peptidy, obsahující fosforylované tyrosinové zbytky. V první řadě je třeba ochránit amino skupinu terc-butoxykarbonylen. Poté jsou fosfopeptidy reakcí s karbodiimidem a ethanolaminem převedeny na fosforamidované resp. amidované deriváty. V následném kroku jsou fosfátové skupiny regenerovány roztokem zředěné TFA a dojde k odštěpení ethanolaminu. Posledním krokem je reakce fosfátové skupiny s cysteaminem a redukce disulfidických můstků za vzniku volných SH-skupin. Takto chemicky pozměněné peptidy reagují svou thiolovou skupinou s kyselinou jodoacetamidovou, imobilizovanou na vhodnou matici. Fosopeptidy jsou po separačním kroku odštěpeny z nosiče TFA, čímž se i odstranění chránící skupiny na amino skupině [53, 57].



#### **1.4.2.4. Metody využívající fosfospecifické protilátky**

Fosfospecifické protilátky představují další možnost pro separaci fosfoproteinů popř. fosfopeptidů. Imunoprecipitace je považována za jednu z nejjednodušších metod pro separaci nebo obohacení fosfoproteinů nebo fosfopeptidů. Nicméně úspěšnost tohoto postupu je ve velké míře závislá na vlastnostech použitých specifických protilátek. Při imunoprecipitaci aplikované pro separaci fosfoproteinů nebo fosfopeptidů jsou používány protilátky vytvořené proti fosforylovaným aminokyselinám. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při identifikaci fosfoproteinů [58, 59, 60, 61] nebo fosfopeptidů [62, 63, 64] obsahujících fosforylovaný tyrosinový zbytek.

Na druhé straně použití fosfospecifických protilátek proti P-serinu a P-threoninu neposkytovalo tak uspokojivé výsledky při selektivní separaci odpovídajících fosfoproteinů. Tyto protilátky totiž velmi často rozpoznávají i sekvenci aminokyselin obklopující fosforylovaný aminokyselinový zbytek, proto jsou schopné specificky imunoprecipitovat pouze některé fosfoproteiny [65].

Nicméně imunoprecipitace s použitím kombinace několika typů anti P-tyrosin/ P-serin protilátek byla popsána Grønborgem et al. [25] nebo také imunoprecipitace fosfoproteinů obsahujících fosforylovaný threoninový zbytek pomocí anti P-threonin specifických protilátek [66].

Vedle imunoprecipitace byly protilátky specifické pro P-tyrosin imobilizovány na magnetické částice s navázaným proteinem G a úspěšně použity k separaci fosfopeptidů z proteolytické směsi nefosforylovaných peptidů [67].

#### **1.4.3. Fosfo-specifické protilátky**

Přestože aplikace specifických protilátek v různých proteomických studiích zahrnujících i posttranslační modifikace proteinů, představuje významný nástroj, v případě fosforylovaných proteinů existují dosud nevyřešené problémy, které limitují jejich úspěšné používání. Vedle problémů, které se týkají samotných fosforylovaných proteinů (jako např. měnící se koncentrace v buňce, nízké zastoupení, současná přítomnost stejného nemodifikovaného proteinu, možnost výskytu více fosforylovaných forem téhož proteinu, apod.), úspěšnost využití metod založených na imunochemických reakcích závisí na schopnostech protilátek rozpoznávat tuto modifikaci proteinů [68].

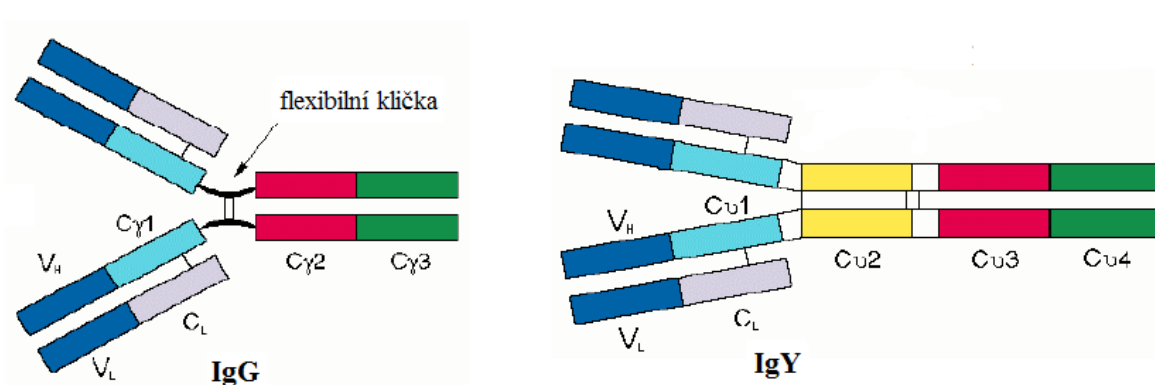
V literatuře je možné rozlišit využití několika typů fosfo-specifických protilátek první skupinu tvoří:

- polyklonální nebo monoklonální protilátky generované proti O-fosforylovaným aminokyselinám; buď P-serin, P-threonin nebo P-tyrosin jsou navázány na nosný protein (nejčastěji je to KLH či BSA) a vzniklý konjugát je používán jako imunogen [66, 69, 70, 71]. Tyto protilátky rozpoznávají fosforylované aminokyseliny bez ohledu na okolní aminokyselinové sekvence a v řadě případů byly užitečnými nástroji při studiu buněčné aktivace a signálních mechanismů. Úspěšné bylo použití protilátek specifických proti P-tyrosinu [69, 70, 72]. Do této skupiny patří i většina komerčně nabízených fosfo-specifických protilátek.
- druhou skupinu protilátek tvoří protilátky, které rozeznávají fosforylovaný aminokyselinový zbytek v kontextu s aminokyselinovými sekvencemi obklopujícími modifikovanou aminokyselinu („Phosphosite-specific antibodies“); v tomto případě jako imunogen slouží vybraný vhodný peptid navázaný na nosný protein (opět nejčastěji KLH, BSA) [73, 74].

Oba dva přístupy mají své výhody a nevýhody. Nevýhody v obou případech však limitují obecné využití fosfo-specifických protilátek jak k separaci, tak k detekci a identifikaci fosfoproteinů a většinou vyžadují ještě další experimentální postupy. Při přípravě imunogenu pro generaci fosfospecifických protilátek proti fosforylovaným aminokyselinám byla použita nejčastěji karbodimidová reakce, jako např. v případě P-threoninu, který byl buď přímo vázán na KLH a BSA [66] nebo v případě P-threoninu, P-serinu a P-tyrosinu na sukcinylovaný derivát BSA [75]. KLH je měď obsahující polypeptid ze skupiny nehemových proteinů, pocházející z mořského plže *Megathura crenulata*. Je imunogenní díky faktu, že je to pro imunitní systém imunizovaného zvířete fylogeneticky vzdálený protein, který je ještě k tomu poměrně velký. Je tvořen z více podjednotek o molekulové hmotnosti kolem 390 000 [76]. Alternativní možnost vazby P-tyrosinu na KLH představuje reakce při použití glutardialdehydu [77].

## 1.5. Slepíčí protilátky

Původně byly popsány jako imunoglobuliny podobné savčím IgG. V roce 1969 Leslie a Clemem [78] prokázali, že mají rozdílnou strukturu a že jsou spíše předchůdci savčích IgE a IgG a dostaly označení IgY z anglického yolk – žloutek. Stejně jako jim podobný IgG mají dva těžké řetězce o molekulové váze mezi 67-70 kDa a dva lehké řetězce o molekulové váze 25 kDa. Hlavní rozdíl (obr. 2) je v počtu konstantních domén. Zatímco IgG má konstantní domény tři (označené jako  $C\gamma 1$ -  $C\gamma 3$ ) u IgY jsou to domény čtyři ( $C\gamma 1$ -  $C\gamma 4$ ). Jedna konstantní doména navíc s 2 polysacharidovými řetězci dává celkovou molekulovou hmotnost 150 kDa v porovnání se 180 kDa pro imunoglobulin třídy G. Slepíčí imunoglobulin je navíc méně flexibilní, protože postrádá flexibilní kličku mezi  $C\gamma 2$ -  $C\gamma 3$ , což je charakteristickým znakem pro savčí imunoglobuliny [79, 80].



**Obr. 2**

**Porovnání savčího imunoglobulinu (IgG) a slepičího (IgY).**  $V_H$ : variabilní část těžkého řetězce,  $V_L$ : variabilní část lehkého řetězce,  $C\gamma$  resp.  $C\gamma 1$ : konstantní domény těžkého řetězce IgG resp. IgY. Převzato a upraveno z [79]

### 1.5.1. Imunoglobuliny u ptáků

Imunitní systém u savců je schopen tvořit ohromné množství protilátek, kdy každá rozeznává jiný epitop. Taková rozmanitost je zajištěna přeuspořádáním genových

segmentů označených jako „variable“ (V), „diversity“ (D) a „joining“ (J). Dále k ní přispívají i bodové mutace [81]. U slepic je ovšem vývoj B-lymfocytů produkujících protilátky jiný. Místo takového přeskupování genových segmentů po setkání s antigenem k tomuto přeskupení dojde pouze jednou a to v průběhu embryogeneze. A tudíž počet přeskupení je dán počtem prekurzorů B-lymfocytů ve Fabrizioově burze, což je asi  $2-3 \times 10^4$ . Místo toho ptáci využívají 25 pseudogenů pro lehký řetězec a přibližně 100 pro řetězec těžký, které jsou v procesu zvaném genová konverze náhodně vsunuty do V segmentu. Tímto způsobem jsou tedy ptáci schopni produkovat též velké množství rozdílných imunoglobulinů. Slepice produkují 3 třídy imunoglobulinů: IgA, IgM a IgY [82, 83]. IgY je funkčně podobný savčímu IgG s koncentrací kolem 5 mg/ml je to hlavní imunoglobulin séra [78]. Podobně jako u savců i u slepic musí být předány embryu mateřské protilátky pro zajištění imunity budoucího potomka. Během putování vejcovodem se do vaječného bílku ukládají IgM a IgA, zatímco IgY je pomocí specifického přenašeče ukládán ve žloutku, kde je jeho koncentrace kolem 10-25 mg/ml. [78, 83]

### **1.5.2. Purifikace slepičích protilátek**

Na rozdíl od savců odběr imunoglobulinové frakce představuje pouhý sběr vajec a není tedy tak invazivní a stresující pro zvíře. U slepičích protilátek je potřeba pro jejich izolaci z vaječného žloutku zvolit jinou strategii, protože neváží protein A ani G., čehož se využívá u purifikace protilátek savčích. Jednou z technik je precipitace polyethylenglykolem. Žloutek je smíchán s destilovanou vodou v poměru 1:9 a roztok je okyselen na pH 5,0. Následně je proveden první precipitační krok při konc. polyethylenglykolu 3,5 % čímž se odstraní lipidová složka žloutku Druhý precipitační krok, ve kterém se již sráží imunoglobuliny je při 12,5 % [84, 85]. Jiný postup je založen na využití ultrafiltrace pomocí membrány z modifikovaného polyethersulfonu při pH 6,7 [86]. Je možné využít i afinitní purifikaci protilátek přímo z roztoku žloutku použitím syntetického ligandu označeného jako PAM („Protein A Mimetic“) [87].

### 1.5.3. Aplikace slepičích protilátek

Jak již bylo řečeno slepičí protilátky neváží svou Fc částí bakteriální proteiny A a G. Dále neváží lidský rheumatoidní faktor (druh protilátky, která je produkována imunitním systémem a je namířena proti vlastním imunoglobulinům) a nespouští komplement, což je soubor asi sérových 40 glykoproteinů, které tvoří humorální odpověď. Neváží ani HAMA („human anti-mouse antibodies“), které vznikají po podání myši terapeutické monoklonální protilátky v organismu příjemce do 2-3 týdnů po prvním podání. Slepičí protilátky jsou tudíž vhodným diagnostickým nástrojem, protože nevzniká falešná pozitivita během testování lidského séra, jak tomu může být při použití savčího IgG. Další výhoda plyne z faktu, že ptáci jsou fylogeneticky vzdáleni od savců a tak je možná produkce protilátek proti vysoce konzervovaným savcím proteinům jakými jsou například hormony. Jejich použití při imunochemických technikách využívajících protilátky, snižuje hodnotu pozadí, protože nevzniká křížová reaktivita [79, 80].

Slepičí protilátky byly již použity v klinické praxi při diagnostice rakoviny prsu [88], vaječníků [88, 89] či žaludku [90]. Své použití nalézají i při výrobě antiséra proti hadímu a škorpiónímu jedu. Takto připravené antisérum prokázalo schopnost zastavit potenciálně škodlivý a smrtící účinek těchto jedů a navíc s nižším výskytem vedlejších účinků jakým je velmi často anafylaktický šok [91].

### 1.5.4. Fosfospecifické slepičí protilátky

Navzdory výše uvedeným výhodným vlastnostem slepičích protilátek jsou používány v daleko menším měřítku a pro jejich širší využití je nutno vyvinout vyššího úsilí v oblasti jejich výzkumu. Podařilo se nalézt pouze jedinou firmu, která nabízí již připravené slepičí protilátky proti fosforylovaným aminokyselinám (P-threoninu, P-serinu a P-tyrosinu), kde jako imunogen byla použita konkrétní fosforylovaná aminokyselina konjugovaná s BSA. Touto firmou je Boston Express Laboratory (Quincy, USA) [92].

Další firmy pak nabízí přípravu protilátek na zakázku:

- Protein Mods (Madison, USA) [93],
- Aves Labs, Inc. (Oregon, USA) [94] - nabízí výrobu polyklonálních fosfospecifických protilátek na zakázku; jako imunogen je používán syntetický peptid, který obsahuje fosforylovanou aminokyselinou.;
- Creative Biolabs (Shirley, USA) [95] produkuje monoklonální slepičí protilátky na zakázku;

## **2. Cíl práce**

Úkolem předkládané diplomové práce byla příprava slepičích protilátek specifických pro O-fosforylované aminokyselinové zbytky fosfoproteidů. Případné specifické protilátky, které v případě protilátek z vaječných žloutků je možné získat ve větším množství, by mohly být následně použity pro přípravu afinitních maticí různého typu, umožňující specifickou separaci fosfopeptidů; v kombinaci s analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie pak identifikaci fosforylačních míst fosfoproteinů.

Téma předkládané diplomové práce navazuje na výsledky diplomové práce Terezy Emmerové [96]: v jejím případě byl zvolen jako imunogen fosforyl-O-L-serin navázaný na maleylovaný derivát KLH. Získané protilátky po afinitním přečištění vykazovaly určitý stupeň nespecifických interakcí, zvláště pro maleylovaný derivát BSA.

Úkolem předkládané diplomové práce bylo použít pro přípravu slepičích protilátek specifických pro O-fosforylované aminokyselinové zbytky proteinů jiný typ imunogenu pro imunizaci slepic – směs fosfopeptidů a jejich imobilizaci na jiný protein, v našem případě BSA.

Cílem diplomové práce bylo:

- a) separovat směs fosfopeptidů získaných tryptickým štěpením  $\alpha$ -kaseinu pomocí IMAC chromatografie;
- b) imobilizovat získanou směs fosfopeptidů na maleylovaný derivát BSA a použít jako imunogen;
- c) frakci protilátek získanou ze žloutku separovat pomocí afinitní chromatografie;
- d) pomocí ELISA testu zjistit specifitu získaných protilátek a porovnat se specifitou protilátek připravených T. Emmerovou [96] pomocí jiného imunogenu;
- e) na základě získaných výsledků pak navrhnout modifikaci postupu pro přípravu vhodnějšího typu imunogenu.

## **3. Materiál a metody**

### **3.1. Použitý materiál a chemikálie**

#### **3.1.1. Chemikálie**

$\alpha$ -kasein, prasečí pepsin A, fosvitin, kyselina trifluoroctová, dithiotreitol, hovězí sérový albumin (BSA), želatina z rybí kůže, myoglobin, TEMED, akrylamid, N,N'-methylenbis(akrylamid), merkptoethanol, Coomassie brilliant blue R-250, N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimid, O-fosforyl-L-serin, IDA-Sepharosa, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonát), sekundární králičí protilátka proti slepičí značená alkalickou fosfatase (Sigma-Aldrich Praha, Česká republika);

- CNBr-aktivovaná Sepharosa 4B (Amersham Biosciences, Uppsala, Švédsko);
- trypsin (Promega Madison, WI, USA);
- glycin (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Německo);
- EDTA (IPL, Uherský Brod, Česká Republika);
- sekundární králičí protilátka proti slepičí protilátce značená křenovou peroxidase (Vidia spol. s.r.o, Jesenice u Prahy, Česká republika);

MA-BSA, O-fosforyl-L-seryl-MA-BSA (připraveny Terezou Emmerovou [96], (chemikálie Sigma-Aldrich Praha, Česká republika).

#### **3.1.2. Slepičí protilátky**

Imunoglobulinová frakce z vaječného žloutku od slepice, která byla imunizovaná triptyckými štěpy  $\alpha$ -kaseinu, navázanými karbodiimidovou reakcí na hovězí sérový albumin (BSA a kontrolní protilátka (imunoglobulinová frakce ze žloutku od slepice před imunizací) byly připraveny firmou Hena, s.r.o. (Praha, Česká republika).



## 3.2. Použité přístroje

- Spektrofotometr: Multiscan Micro plate Reader MCC/340 (Thermo FisherScientific, Waltham, MA, USA)
- K temperování byl použit Incubator with Orbital Shaker SI50 (Stuart Scientific, Stone, UK)
- Mikrocentrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburk, SRN)
- Pro IMAC detekci byl použit detektor: Opal fixed wavelenght detektor (ECOM spol s.r.o, ČR)
- Milli-Q systém pro přípravu vody (Millipore, Billerica, MA, USA)

## 3.3. Příprava imunogenu

### 3.3.1. Příprava fosfopeptidů $\alpha$ -kaseinu

#### Chemikálie a roztoky:

- $\alpha$ -kasein
- 0,025 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$
- roztok trypsinu v 0,025 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (0,5 mg/ml)
- koncentrovaná kyselina trifluoroctová (TFA)
- 0,1 M acetátový pufr (pH 3,5)

#### Postup:

Roztok  $\alpha$ -kaseinu (100 mg) ve 0,025 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (20 ml) byl smíchán s roztokem trypsinu v 0,025 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (0,5 mg/ml) a výsledný roztok byl inkubován při 37° C po dobu 18 hod. Po inaktivaci trypsinu okyselením na pH 4 (koncentrovaná TFA) byl roztok zředěn v poměru 1:1 0,1 M acetátovým pufr, pH 3,5. Celkový objem byl 50 ml.

### 3.3.2. Separace fosfopeptidů $\alpha$ -kaseinu

#### Chemikálie a roztoky:

- IDA-Sepharosa
- 0,2 M roztok EDTA
- 0,05 M roztok FeCl<sub>3</sub>
- 0,1 M acetátový pufr, pH 3,5
- 0,05 M fosfátový pufr, pH 6,2

#### Postup:

IDA-Sepharosa (2g) byla ponechána bobtnat v 1 mM roztoku kyseliny chlorovodíkové (10 ml) a po jedné hodině promyta 25 ml destilované vody. Promytý gel (5 ml) byl přemístěn do kolony (Econo-Column, 1 x 10 cm, 8 ml) a promyt postupně 0,05 M FeCl<sub>3</sub> (2 ml), destilovanou vodou (50 ml) a 0,1 M acetátovým pufrem, pH 3,5. Směs peptidů získaná proteolytickým štěpením  $\alpha$ -kaseinu trypsinem (50ml) byla nanesena na sloupec Fe(III)-IDA-Sepharosy a sloupec byl promýván 0,1 M acetátovým pufrem, pH 3,5 tak dlouho až absorbance měřená při 280 nm klesla přibližně k nule. Adsorbované peptidy byly eluovány 0,05 M fosfátovým pufrem pH 6,2. Frakce byly sbírány nejprve po 5 minutách a následně po 1 minutě. Ve všech frakcích byla měřena absorbance při 280 nm. Po skončení eluce byl afinitní nosič promyt 0,2 M EDTA (20 ml) a 0,1 M acetátovým pufrem, pH 3,5 (50 ml), ve kterém byla uchována pro další použití.

### 3.3.3. Konjugace fosfopeptidů $\alpha$ -kaseinu pomocí karbodiimidové reakce

#### Chemikálie a roztoky:

- MA-BSA
- 0,1 M MES (obsahující 0,1 M NaCl)
- EDC
- NHS
- 0,2 M uhličitanový pufr (pH 9,6)

#### Postup:

K roztoku MA-BSA v 0,1 M MES obsahující 0,5 M NaCl (1,5 mg v 1,5 ml) bylo přidáno 0,6 mg EDC a 1 mg NHS a reakční směs byla míchána 20 minut při laboratorní teplotě. Pomocí 0,2 M uhličitanového pufru, pH 9,6 bylo pH roztoku upraveno na hodnotu 8. K reakční směsi (výsledný objem 3,7 ml) byl přidán roztok (1,5 ml) fosfopeptidů (o koncentraci přibližně 1 mg/ml), získaných tryptickým štěpením  $\alpha$ -kaseinu a separovaných pomocí chromatografie na Fe(III)-IDA-Sepharosu. Směs byla třepána 2 hodiny při laboratorní teplotě a nakonec bylo přidáno 14 mg glycinu.

### **3.4. Separace imunoglobulinové frakce z roztoku žloutku**

Byla provedena profesorem Hodkem z katedry biochemie, Přírodovědecké fakulty UK, za použití protokolů dle Polsona [84, 85].

### **3.5. Afinitiní chromatografie slepičích protilátek na Sepharose s imobilizovaným $\alpha$ -kaseinem**

#### **3.5.1. Imobilizace $\alpha$ -kaseinu na CNBr- Sepharosu**

#### Chemikálie a roztoky:

- CNBr- Sepharosa 4B
- $\alpha$ -kasein
- vazebný pufr: 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,3 (obsahující 0,5 M NaCl)
- 1 mM HCl
- 0,2 M roztok glycinu, pH 8,0
- 0,15 M NaCl, 1 M NaCl

#### Postup:

CNBr-aktivovaná Sepharosa 4B (1,5 g) byla rozmíchána v 1 mM HCl (50 ml) a byla ponechána 1 hod bobtnat při 25°C. Poté byl gel přenesen na fritu a promyt 1 mM HCl (50 ml). Roztok  $\alpha$ -kaseinu ve vazebném pufru (50 mg v 6 ml) byl smíchán s CNBr-Sepharosou (3ml) promytou vazebným puftrem (15 ml). Suspense byla třepána přes noc při 4°C. Poté byl gel na fritě promyt vazebným puftrem (15 ml) a pro zablokování neobsazených aktivních skupin byl ke gelu přidán 0,2 M roztok glycinu, pH 8,0 (2 ml). Suspenze byla při laboratorní teplotě mírně třepána po dobu 2 hod. a poté na fritě postupně promyta po 50 ml destilovanou vodou, 0,15 M NaCl, 1 M NaCl, a 0,15 M NaCl. Množství navázaného  $\alpha$ -kaseinu bylo přibližně určeno na základě měření absorbance při 280 nm z rozdílu koncentrace původního roztoku ligandu před imobilizací a množství nenavázaného proteinu v supernatantu a v prvních promývacích frakcích po imobilizaci: 7,3 mg  $\alpha$ -kaseinu na 0,5 ml Sepharosového gelu.

### **3.5.2. Purifikace slepičích protilátek na Sepharose s imobilizovaným $\alpha$ -kaseinem**

#### Chemikálie a roztoky:

- slepičí protilátka-(1)
- kontrolní (pre-imunní) protilátka-(K1), (imunoglobulinová frakce získaná ze žloutků od slepice před podáním antigenu),
- TBS: 0,05 Tris/HCl pufr, pH 7,4 (obsahující 0,15 M NaCl)
- 0,05 M diethylamin (pH 11,5)
- 1 mM HCl
- TBS obsahující 0,1% azid sodný

#### Postup:

Izolované slepičí protilátky-(1) a kontrolní pre-immunní protilátka-(K1) připravené prof. Hodkem, byly zředěny pomocí TBS (0,05 M Tris/HCl obsahující 0,15 M NaCl, pH 7,4) v poměru 1:1 (0,25 ml roztoku protilátky + 0,25 ml TBS). Sepharosa s imobilizovaným  $\alpha$ -kaseinem byla přenesena do dvou mikrozkušavek po (0,5 ml) a smíchána s roztokem slepičích protilátek (0,5 ml o koncentraci 7,2 mg/ml) resp. pre-

imunní protilátky (0,5 ml o koncentraci 7,1 mg/ml). Mikrozkušavky byly ponechány při 4°C inkubovat přes noc za mírného míchání. Po inkubaci s protilátkou resp pre-immunní protilátkou byl gel přenesen do kolony (Econo-Column, 0,5 x 15 cm, 3ml) nosič byl promýván pomocí TBS (0,05 M Tris/HCl pufrém obsahujícím 0,15 M NaCl, pH 7,4) v odebíraných frakcích (po 0,5 ml) byla měřena absorbance při 280 nm. Nosič byl promýván tak dlouho, dokud absorbance při 280 nm neklesla téměř k nule. K eluci specificky adsorbovaných protilátek IgY byl použit 0,05 M diethylamin, pH 11,5. Eluční frakce byly jímány do mikrozkušavek obsahujících 1 M, citrátový pufr, pH 6,5 (200  $\mu$ l), sloužícího k neutralizaci pH eluátu na hodnotu 7,2 až 7,4; byly jímány 0,5 ml frakce. Průběh chromatografie byl sledován měřením absorbance při 280 nm. Frakce vykazující nejvyšší hodnotu absorbance při 280 nm byly spojeny. Spojené frakce byly dialyzovány přes noc při 4° C proti 1000 ml TBS (obsahujícím 0,1% azid sodný).

### **3.6. Afinitní chromatografie slepičích protilátek na Sepharose s imobilizovaným BSA**

Postup imobilisace BSA na CNBr-Sepharosu byl analogický jako v případě imobilizace  $\alpha$ -kaseinu ; pro vazbu na Sepharosu bylo použito 30 mg BSA. Taktéž i průběh afinitní chromatografie na BSA-Sepharose byl analogický jako v případě separace slepičích protilátek na imobilizovaném  $\alpha$ -kaseinu.

#### **3.6.1. Stanovení koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích slepičích protilátek**

Koncentrace získaných slepičích protilátek v jednotlivých frakcích získaných afinitní chromatografií byla přibližně určena měřením absorbance roztoku protilátky (50  $\mu$ l) v TBS (2,5 ml) při 280 nm.

### **3.7. ELISA test - zhodnocení specifity separovaných slepičích protilátek**

#### **3.7.1. Příprava syntetických antigenů (fosforyl-O-L-seryl-BSA a maleyl-myoglobin)**

##### Chemikálie a roztoky:

- 0,05 M uhličitanový pufr, pH 9,5
- BSA
- myoglobin
- P-serin
- *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylkarbodiimid
- 1 M roztok anhydridu kyseliny maleinové v dioxanu
- 1 % NaOH

##### Postup:

##### O-fosforyl-L-seryl-BSA:

K roztoku BSA (20 mg) v 0,05 M uhličitanovém pufru, pH 9,5 (5 ml) byl přidán P-serin (75 mg) a opatrně po kapkách *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylkarbodiimid (86 µl). Směs byla třepána přes noc při 25° C a následně dialyzována proti destilované vodě.

##### Maleyl-myoglobin:

K roztoku myoglobinu (20 mg) v 0,05 M uhličitanovém pufru, pH 9,5 (5 ml) chlazeného ledem byl přidán po kapkách 1 M roztok anhydridu kyseliny maleinové v dioxanu (1,5 ml). Hodnota pH byla upravena 1 % NaOH na 9,0. Směs byla inkubována 5 minut chlazená ledem a poté dialyzována při 4° C přes noc proti 0,15 M NaCl.

### 3.7.2. Provedení ELISA testu s protilátkou značenou alkalickou fosfátasou

#### Chemikálie a roztoky:

- antigeny: ( $\alpha$ -kasein, ovalbumin, fosfopeptidy z  $\alpha$ -kaseinu ( MA-BSA, BSA, fosvitin, P-seryl-BSA, myoglobin, MA-myoglobin, P-seryl-MA-BSA)
- slepičí protilátky
- králičí protilátka proti slepičím protilátkám značená alkalickou fosfátasou
- králičí protilátka proti slepičím protilátkám s křenovou peroxidasou
- vazebný pufr: 0,05 M uhličitanový pufr, (pH 9,6)
- promývací pufr: TBS (0,05 Tris/HCl pufr, pH 7,4 obsahující 0,15 M NaCl a 0,05% Tween-20)
- želatina z rybí kůže
- p-nitrofenylfosfát
- 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>
- 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- 1 M MgCl<sub>2</sub>

#### Postup:

##### **a) Imobilizace antigenů**

Na mikrotitrační destičku F16 Polysorp Unfra (Roskilde, Dánsko) byly imobilizovány následující antigeny:  $\alpha$ -kasein, ovalbumin, fosfopeptidy izolované z  $\alpha$ -kaseinu po štěpení trypsinem, MA-BSA, BSA, fosvitin, P-seryl-BSA, P-seryl-MA-BSA myoglobin a MA-myoglobin). Byly připraveny zásobní roztoky všech antigenů o koncentraci 1 mg/ml TBS (obsahující Tween-20). Zásobní roztoky antigenů byly pomocí vazebného 0,05 M, uhličitanového pufru pH 9,6 zředěny na výslednou koncentraci 4  $\mu$ g/ml. Takto získané roztoky antigenů byly po 100  $\mu$ l nepipetovány do jamek mikrotitrační destičky a ponechány inkubovat při 37° C po dobu jedné hodiny. Následně byl vazebný roztok odstraněn a destička byla 5x promyta promývacím pufrem. Pro zabránění nespecifické interakce bylo do každé jamky napipetováno 150  $\mu$ l blokovacího roztoku (2% roztok želatiny z rybí kůže v Tris/HCl s 0,05% Tween-20) a destičky byly ponechány inkubovat 1 hodinu při 37° C. Blokovací roztok byl poté odstraněn a destička byla 5x promyta promývacím pufrem.

## **b) Aplikace primární protilátky**

Na mikrotitrační destičku byly nanесeny následující primární protilátky:

- nepurifikovaná slepičí protilátka: (1) frakce slepičích protilátek separovaných pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaném  $\alpha$ -kaseinu: neadsorbovaná frakce: P(KAS)1, adsorbovaná frakce: E(KAS)1
- frakce slepičích protilátek separovaných pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaném BSA-Sepharose (neadsorbovaná frakce): P(BSA)1, adsorbovaná frakce: E(BAS)1
- nepurifikovaná kontrolní (pre-imunní) protilátka: (K1)
- frakce kontrolních slepičích protilátek (K1) separovaných pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaném  $\alpha$ -kaseinu (neadsorbovaná frakce): P(KAS)K1, adsorbovaná frakce: E(KAS)K1,
- frakce kontrolních slepičích protilátek (K1) separovaných pomocí afinitní chromatografie na BSA-Sepharose (neadsorbovaná frakce): P(BAS)K1, adsorbovaná frakce: E(BAS)K1

Roztoky obsahující slepičí protilátky byly zředěny pomocí TBS (obsahující 0,05% Tween-20) na koncentraci 9, 45 a 90  $\mu$ g proteinu na 1 ml. Tyto roztoky byly v paralelním provedení (pro každý antigen a každou koncentraci protilátky) po 100  $\mu$ l nanесeny do jamek mikrotitrační destičky. Mikrotitrační destička byla poté ponechána inkubovat při 4° C přes noc. Po odstranění roztoků protilátek a kontrolních protilátek byla destička 5x promyta promývacím pufrem.

## **c) Aplikace sekundární protilátky značené alkalickou fosfatou**

Sekundární protilátka (králičí protilátka proti slepičím protilátkám, značená alkalickou fosfatou) byla ředěna v poměru 1: 2000 pomocí TBS (obsahujícím 0,05% Tween-20) a po 100  $\mu$ l nanесena do jamek mikrotitrační destičky. Destičky byly ponechány inkubovat při 37° C po dobu jedné hodiny. Nezachycená sekundární protilátka byla odstraněna a destička byla 5x promyta promývacím.

Jako substrát pro alkalickou fosfatou byl použit p-nitrofenylfosfát. Roztok substrátu byl připraven rozpuštěním p-nitrofenylfosfát (15 mg) ve směsi obsahující 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> (2,1 ml), 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,5 ml), 1 M MgCl<sub>2</sub> (15  $\mu$ l) doplněné destilovanou vodou na výsledných 15 ml. Do každé jamky bylo napipetováno po 100  $\mu$ l tohoto



roztoku a destička byla inkubována 10 min. Absorbance byla změřena na při vlnové délce 405 nm.

#### **d) Aplikace sekundární protilátky značené křenovou peroxidasou**

Pro srovnání byla použita ještě druhá sekundární protilátka proti slepičím protilátkám, a to králičí protilátka proti slepičím protilátkám značená křenovou peroxidasou. V tomto případě bylo ředění sekundární protilátky 1:1000 v TBS (obsahujícím 0,05% Tween-20) a jako druhý substrát vedle peroxidu vodíku byl použit 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonát), který v případě pozitivní reakce poskytuje zelené zbarvení roztoku. Roztok substrátů pro křenovou peroxidasu byl připraven následujícím postupem: 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonát (2 mg) byl rozpuštěn v 0,05 M citrátového pufru, pH 5,0 (20 ml) a k roztoku byl přidán 30 % peroxid vodíku (10 µl). Roztok substrátu byl napipetován po 100 µl do každé jamky a destička byla inkubována 10 min. Enzymová reakce byla poté zastavena přidáním 1% SDS (100 µl). Absorbance byla změřena na při vlnové délce 405 nm.

### **3.8. MALDI-TOF analýza**

Měření na hmotnostním spektrometru provedl RNDr. Petr Příkryl, PhD z Ústavu patologické fyziologie, 1. lékařské fakulty UK v Praze na MALDI-TOF/TOF hmotnostním spektrometru Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Brémy, SRN).

## **4. Výsledky**

### **4.1. Příprava slepičích protilátek proti O-fosforylovaným aminokyselinovým zbytkům fosfoproteinů**

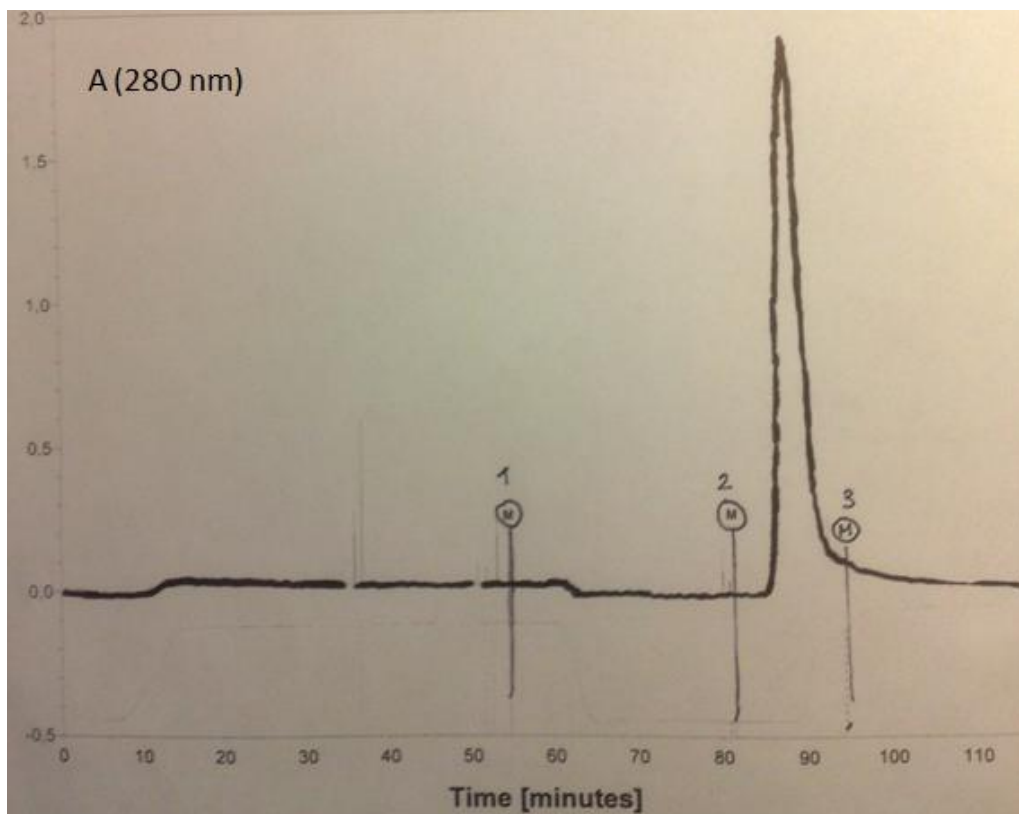
Cílem diplomové práce bylo vyzkoušet nový typ imunogenu pro přípravu slepičích protilátek proti fosforylovaným zbytkům aminokyselin přítomných ve fosfoproteinech. Diplomová práce navazuje na výsledky diplomové práce T. Emmerové [96], která testovala specifitu anti-P-serin specifických slepičích protilátek připravených po imunizaci slepic pomocí P-serinu vázaného na maleylovaný KLH. Získané slepičí protilátky vykazovaly i po afinitním přečištění vedle interakce s  $\alpha$ -kaseinem a P-serinem vázaným na maleylovaný BSA, také nespecifické interakce s maleylovaným BSA.

Pro přípravu slepičích protilátek proti fosforylovanému serinu byl proto zvolen jiný typ imunogenu: byla připravena separovaná směs fosfopeptidů po proteolytickém štěpení  $\alpha$ -kaseinu trypsinem.  $\alpha$ -kasein je mnohonásobně fosforylovaný protein, jehož všechny fosfátové skupiny jsou vázány na serylóvé zbytky. Po štěpení trypsinem se v proteolytické směsi nacházejí fosfopeptidy jak s jednou fosfátovou skupinou, tak i vícenásobně fosforylované peptidy. Separovaná směs fosfopeptidů pomocí afinitní chromatografie na Fe(III)-IDA-Sepharose byla imobilizována na maleylovaný derivát hovězího sérového albuminu.

#### **4.1.1. Příprava imunogenu pro imunizaci slepic**

##### **4.1.1.1. Příprava směsi peptidů $\alpha$ -kasein u štěpením trypsinem a separace fosfopeptidů pomocí IMAC**

Směs peptidů byla připravena štěpením roztoku  $\alpha$ -kaseinu trypsinem. Frakce obohacená fosfopeptidy byla separována ze směsi peptidů po tryptickém štěpení pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaných Fe(III) iontech (IMAC) při použití IDA-Sepharosy [97]. Adsorbovaná frakce byla z afinitního nosiče eluována fosfátovým puforem pH 6.2 (obr. 3).



**Obr 3**

**Separace fosfopeptidů ze směsi peptidů získané tryptickým štěpením  $\alpha$ -kaseinu pomocí afinitní chromatografie na Fe(III)-IDA-Sepharosy**

použité pufrы: 1) 0,1 M acetátový pufr, pH 3,5; 2) 0,05 M fosfátový pufr pH 6,2; 3) 0,2 M EDTA. Použitá kolona (Econo-Column, 1 x 10 cm, 8 ml). Záznam je pořízen za pomoci detektoru: Opal fixed wavelength detektor při  $A_{280}$ .

Předcházejících studie prokázaly [42, 96], že uvedeným způsobem získaná směs peptidů obsahuje fosfopeptidy uvedené v (tab. 1) na následující stránce

Tab. 1

Peptidy separované z proteolytické směsi  $\alpha$ -kaseinu na Fe(III)-IDA modifikovaném magnetickém sorbentu [42, 96].

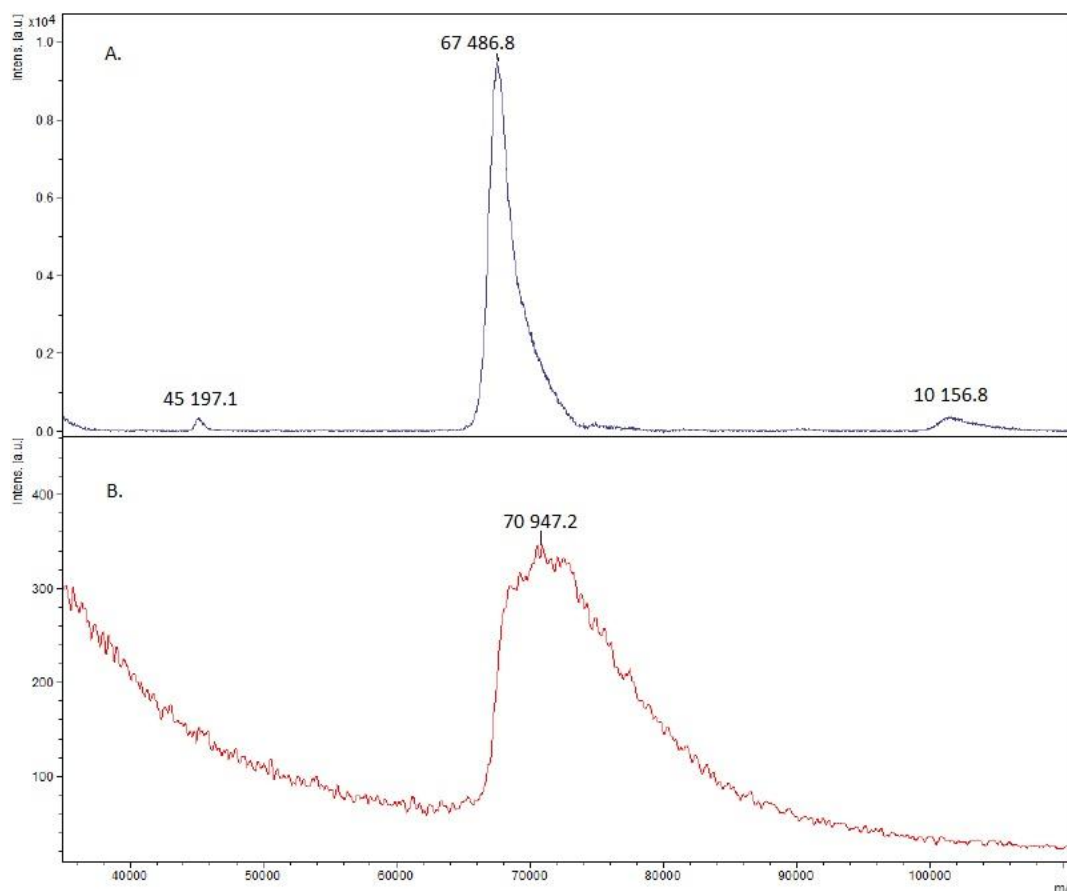
m/z	řetězec	sekvence peptidu	počet fosforylačních míst
1098,68	$\alpha$ -S2-kasein/204-212	AMKPWIQPK	0
1337,81	$\alpha$ -S1-kasein/95-105	HIQKEDVPSEK	0
1466,78	$\alpha$ -S2-kasein/153-164	TVDMEpSTEVFTK	1
1594,90	$\alpha$ -S2-kasein/153-165	TVDMEpSTEVFTKK	1
1660,99	$\alpha$ -S1-kasein/121-134	VPQLEIVPNpSAEER	1
1847,26	$\alpha$ -S1-kasein/58-73	DIGSEpSTEDQAMEDIK	1
1927,84	$\alpha$ -S1-kasein/58-73	DIGpSEpSTEDQAMEDIK	2
1952,21	$\alpha$ -S1-kasein/119-134	YKVPQLEIVPNpSAEER	1
1974,08	neidentifikováno		
2597,82	$\alpha$ -S1-kasein/52-73	VNELpSKDIGSEpSTEDQAMEDIK	2
2720,91	$\alpha$ -S1-kasein/74-94	QMEAEpSlpSpSpSEEVNpSV EQK	5
3007,37	$\alpha$ -S2-kasein/61-85	NANEEYSIGpSpSpSEEpSAEV ATEEVK	4
3131,54	$\alpha$ -S2-kasein/141-165	EQLpSTpSEENSKKTVDMEpST EVFTKK	3

Pozn.: Naměřené hodnoty m/z peptidových iontů byly porovnány s teoretickými hodnotami získanými *in silico* štěpením  $\alpha$ -kaseinu trypsinem. Sekvence takto identifikovaných peptidů byly ověřeny MS/MS analýzou.; pS – fosfoserin

#### 4.1.1.2. Konjugace směsi fosfopeptidů $\alpha$ -kaseinu na maleylovaný derivát BSA

Pro vazbu separované směsi fosfopeptidů  $\alpha$ -kaseinu na BSA byla zvolena karbodiimidová reakce. Pro reakci byl použit maleylovaný BSA (MA-BSA), který byl připraven modifikací proteinu maleinanhidridem (viz kapitola 3.3.3). Fosfopeptidy byly navázány přes svoje volné -NH<sub>2</sub> skupiny na volné karboxylové skupiny maleylovaného BSA. Přítomnost navázaného ligandu na BSA byla analyzována MALDI-TOF hmotnostní analýzou (obr. 4). Uvedené výsledky MALDI-TOF MS analýzy ukazují, že

pomocí karbodiimidové reakce byly separované fosfopeptidy navázány na maleylový derivát BSA.



**Obr. 4**

**MALDI-TOF MS analýza maleylovaného derivátu BSA (a) a imunogenu připraveného navázáním separované směsi fosfopeptidů  $\alpha$ -kaseinu na maleylovaný derivát BSA (b) rel. molekulová hmotnost BSA: 66 432 (UniProtKB Protein Knowledgebase) [98]**

## **4.1.2. Příprava modifikovaných derivátů proteinů pro zjišťování jejich specifity**

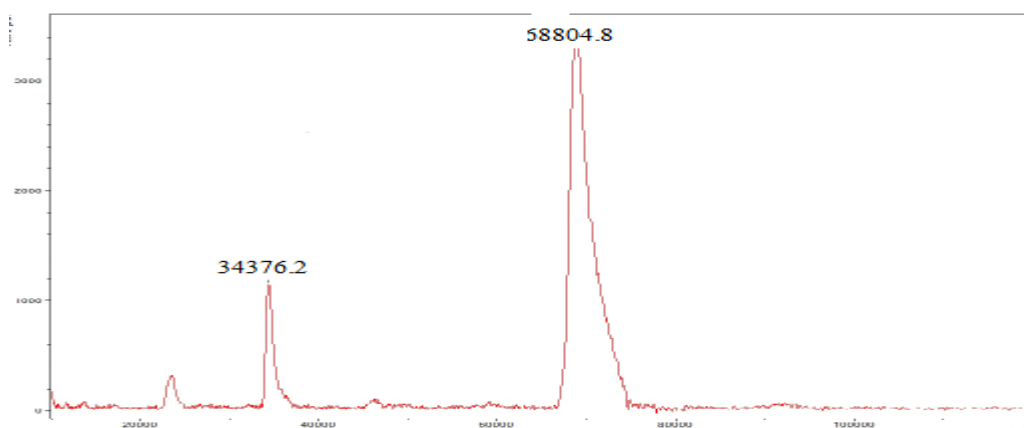
### **4.1.2.1. Maleylace BSA a myoglobinu**

Maleylované deriváty proteinů byly připraveny reakcí s maleinanhydridem, který modifikoval volné aminoskupiny proteinu. Maleylovaný derivát BSA byl jednak použit pro

přípravu imunogenu pro imunizaci slepic (viz kapitola 3.3.3) a jednak pro vazbu fosforyl-O-L-serinu. Vedle toho maleylované deriváty jak BSA, tak myoglobinu byly využity pro studium specifity připravených protilátek. MALDI-TOF MS analýza maleylovaného derivátu BSA je uvedena na (obr. 4)

#### 4.1.2.2. Použití karbodiimidové reakce pro navázání fosforyl-O-L-serinu na hovězí sérový albumin

Byly připraveny dva různé modifikované deriváty BSA obsahující vázaný P-serin. V obou případech byla použita karbodiimidová reakce. V prvním případě byl P-serin navázán přes svojí -NH<sub>2</sub> skupinu na volné karboxylové skupiny maleylovaného BSA za vzniku maleylovaného BSA s navázaným O-fosforyl-L-serinem (p-Ser-MA-BSA) [96] jak je patrné na (obr. 5). V druhém případě byl fosforyl-O-L-serin pomocí karbodiimidové reakce vázán přímo na nemodifikovaný BSA (obr. 6): reakce se účastnily jak -NH<sub>2</sub> tak karboxylové skupiny vázaného ligandu. MALDI-TOF MS analýza připravených derivátů BSA je uvedena na (obr. 5, 6)

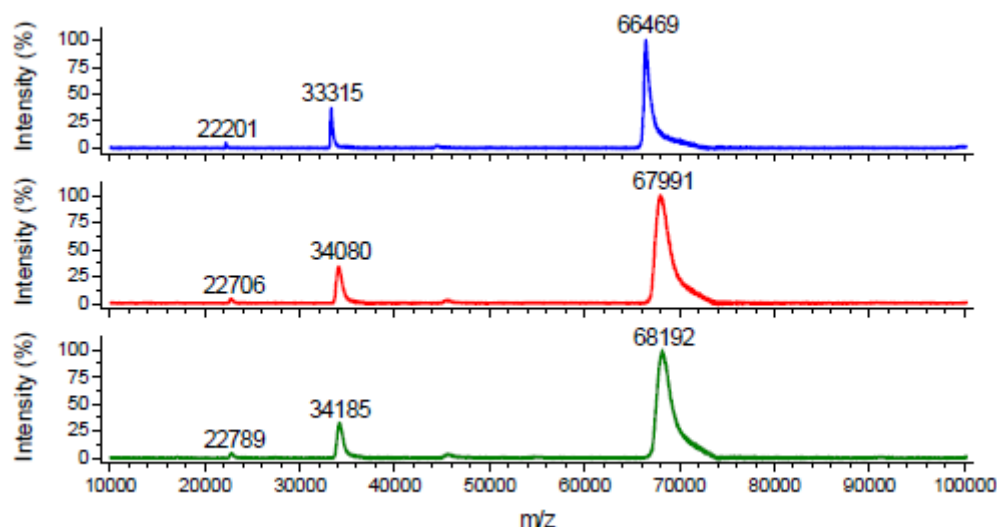


**Obr. 5**

**MALDI-TOF MS analýza derivátu BSA s navázaným fosforyl-O-L-serinem přímo karbodiimidovou reakcí (P-Seryl-BSA)**

Uvedené výsledky MALDI-TOF MS analýzy ukazují, že P-serin byl pomocí karbodiimidové reakce přímo navázán na BSA. Pro srovnání je na (obr. 6) uvedena MALDI-TOF MS analýza derivátu BSA připraveného T. Emmerovou [96], u kterého

byl P-serin vázán na maleylovaný protein (P-Seryl-MA-BSA), který byl také v této diplomové práci používán při studiu specifity slepičích protilátek.



**Obr. 6**

#### **MALDI-TOF MS analýza fosforyl-O-L-serinu vázaného na maleylovaný deivát BSA**

BSA – modře, maleylovaný BSA – červeně, maleylovaný BSA s navázaným fosforyl-O-L-serinem – zeleně. [96]

### **4.1.3. Separace imunoglobulinové frakce ze žloutků**

Slepice byly imunizovány pomocí připraveného maleylovaného BSA s navázanou frakcí fosfopeptidů získanou tryptickým štěpením  $\alpha$ -kaseinu. Separace imunoglobulinové frakce z roztoku žloutků byla provedena P. Hodkem (katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, UK, Praha), za použití protokolů dle Polsona [84, 85]. Stejným způsobem byla separována i kontrolní (pre-imuní) imunoglobulinová frakce (imunoglobulinová frakce ze žloutků získaných od téže slepice před imunizací).

#### 4.1.4. Ověření specifity získaných frakcí protilátek

Koncentrace proteinů ve frakcích slepičích protilátek-(1) a kontrolní (pre-imunní) protilátky-(K1), byla přibližně určena měřením absorbance při 280 nm (viz. tab. 2).

Tab. 2

Koncentrace proteinů ve frakcích slepičí protilátky-(1) a kontrolní (pre-imunní) protilátky-(K1)

Protilátka-(1) [c <sub>mg/ml</sub> ] <sup>a</sup>	Kontrolní protilátky-(K1) [c <sub>mg/ml</sub> ] <sup>a</sup>
26,7	25

<sup>a</sup>koncentrace proteinů přibližně určena z měření absorbance při 280 nm.

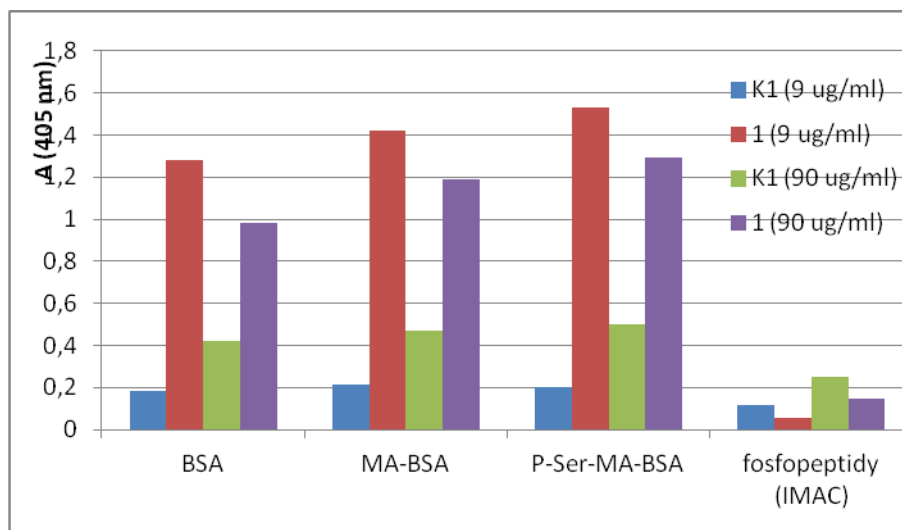
V této části práce bylo nutné nejprve otestovat afinitu získaných protilátek vůči modelovým fosfoproteinům, kterým byly hovězí  $\alpha$ -kasein, fosvitin, ovalbumin.  $\alpha$ -Kasein je mnohonásobně fosforylovaným proteinem a všechny jeho fosfátové skupiny jsou navázány na serinové zbytky [99, 100]. Dalším proteinem byl fosvitin. Jedná se o směs dvou polypeptidů ( $\alpha$ -fosvitinu a  $\beta$ -fosvitinu). 123 aminokyselinových zbytků z celkových 216 jsou serinové zbytky a z nich téměř 96 % je fosforylováno [101]. Posledním použitím fosfoproteinem byl albumin z vaječného bílku (ovalbumin), obsahuje 386 aminokyselinových zbytků, z nichž jsou 2 fosforylované serinové zbytky [102].

Dále byly použity k testování i komponenty imunogenu, kterými byla slepice imunizována: BSA, jeho modifikovaný derivát maleylovaný BSA a frakce fosfopeptidů získaných z  $\alpha$ -kaseinu. A jako poslední byly použity synteticky připravený antigen: P-serin navázaný na maleylovaný BSA, myoglobin a jeho maleylovaný analog.

##### 4.1.4.1. Ověření specifity získaných nepurifikovaných protilátek

Na destičku MaxiSorp<sup>TM</sup> s plochým dnem (F) byly naneseny antigeny: maleylovaný BSA, BSA a fosfopeptidová frakce  $\alpha$ -kaseinu, separovaná na Fe(III)-IDA-Sepharose a P-serin vázaný na maleylovaný BSA. Výsledky testu ukazuje (obr. 7)





**Obr. 7**

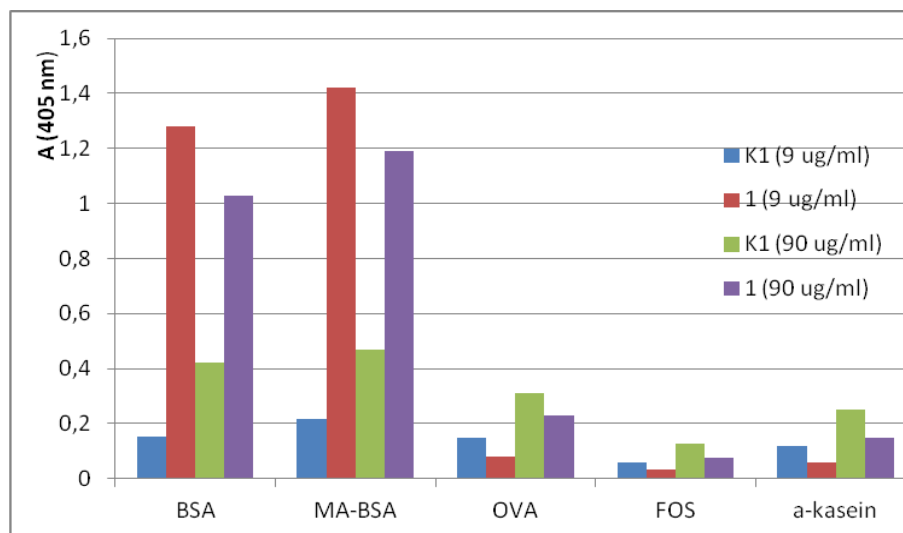
**ELISA test – ověření specifity získaných nepurifikovaných protilátek: slepičí protilátky-(1) a kontrolní (pre-imunní) protilátky-(K1)**

Použité koncentrace: (K1)-kontrolní (pre-imunní) protilátka a slepičí protilátka-(1): 9  $\mu\text{g/ml}$  a 90  $\mu\text{g/ml}$ , [96]; antigeny: 4  $\mu\text{g/ml}$ . MA-BSA: maleylovaný BSA, P-Ser-MA-BSA: fosforyl-O-L-serin vázaný na maleylovaný BSA, fosfopeptidy: separovaná frakce fosfopeptidů  $\alpha$ -kaseinu

Z obrázku je patrné, že protilátka vykazuje zvýšenou specifitu k BSA a jeho maleylovanému derivátu (MA-BSA). Dále je patrné, že s těmito antigeny interaguje i kontrolní sérum. Jedná se o imunoglobulinovou frakci slepice, která ještě nebyla imunizována a tudíž by se teoreticky její imunitní systém s BSA či jeho maleylovaným analogem neměl setkat. V případě syntetického antigenu P-Ser-MA-BSA, je malý rozdíl v hodnotách absorbance mezi ním a MA-BSA. Z toho vyplývá, že protilátka interaguje s maleylovaným BSA, který byl použit jako nosný protein v imunogenu. V případě frakce fosfopeptidů  $\alpha$ -kaseinu, která byla purifikována na Fe(III)-IDA-Sepharose, je interakce v porovnání s výše zmíněnými antigeny nízká.

#### 4.1.4.2. Ověření specifity získaných nepurifikovaných protilátek pomocí modelových fosfoproteinů

V následném testu byly použity 3 modelové fosfoproteiny, kterými jsou ovalbumin,  $\alpha$ -kasein a fosvitin, který má nejvyšší počet fosforylovaných serinových zbytků ze zmíněných tří proteinů. Výsledek testu (obr 8).



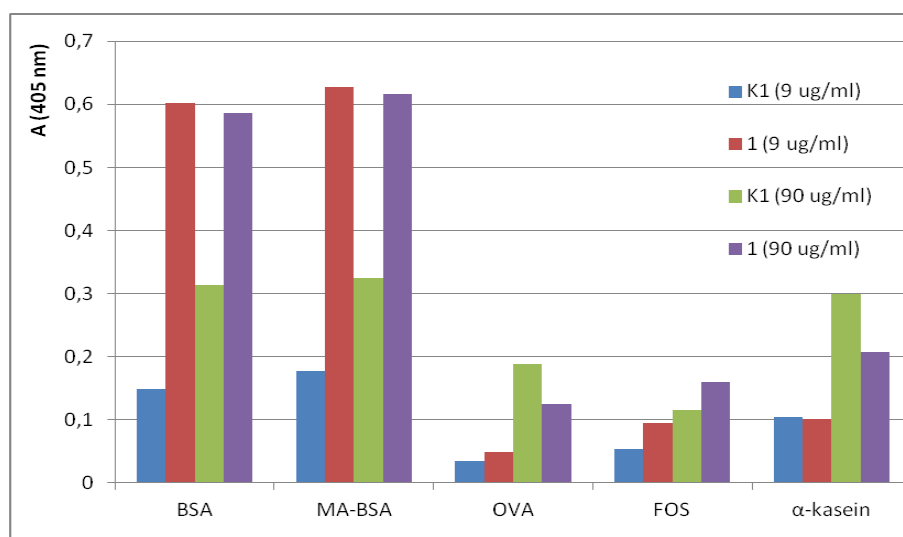
Obr. 8

**ELISA test – ověření specifity získaných nepurifikovaných protilátek: slepičí protilátka (1) a kontrolní (pre-imunní) protilátka (K1) při použití modelových fosfoproteinů a sekundární protilátka značené alkalickou fosfatase**

Použité koncentrace - (K1) kontrolní (pre-imunní) protilátka a slepičí protilátka (1): 9  $\mu$ g/ml a 90  $\mu$ g/ml, [96]; antigeny: 4  $\mu$ g/ml. MA-BSA: maleylovaný derivát BSA, OVA: ovalbumin, FOS: fosvitin.

Tento test potvrzuje velmi nízkou specifitu získaných slepičích protilátek vůči fosforylovaným modelovým proteinům. Zde v případě fosvitinu, který je nejvíce fosforylovaný z uvedených tří modelových proteinů je interakce nejnižší. U ovalbuminu a  $\alpha$ -kaseinu interaguje i kontrolní protilátka. V případě ovalbuminu se jedná o protein slepici vlastní, a tudíž jsou v minoritním množství v jejím těle přítomny určité protilátky, které takovýto protein rozeznávají. Naopak  $\alpha$ -kasein je protein přítomný v hovězím mléce a jedná se o protein organismu slepic cizí. Vyšší interakce v případě kontrolní protilátky se dá vysvětlit možným výskytem tohoto proteinu spolu s BSA v krmných směsích slepic.

V ELISA testech byla používána sekundární králičí protilátka proti slepičím protilátkám značená alkalickou fosfatase a jako substrát byl použit p-nitrofenylfosfát. Při testování specifity získaných nepurifikovaných slepičích protilátek byla zjištěna silná interakce s BSA a maleylovaným derivátem BSA. K vyloučení možnosti, že za pozorovanou silnou interakcí s BSA by mohla být zodpovědná esterasová aktivita serového albuminu [103, 104, 105]. Byla použita v tomto ELISA testu pro srovnání jako sekundární protilátka králičí, rozeznávající slepičí protilátku, značená křenovou peroxidase. Výsledky ELISA testu jsou ukázány na (obr. 9). Z porovnání výsledků získaných při použití sekundární protilátky značené alkalickou fosfatase (obr. 8) a výsledků s protilátkou značenou peroxidase (obr. 9), že zjištěné interakce s modelovými fosfoproteiny mají obdobný charakter a tudíž za zjištěnou silnou interakci s BSA není zodpovědná případná esterasová aktivita sérového albuminu.



**Obr. 9**

**ELISA test – ověření specifity získaných nepurifikovaných protilátek: slepičí protilátky (1) a kontrolní (pre-imunní) protilátky (K1) při použití modelových fosfoproteinů a sekundární protilátky značené křenovou peroxidase**

použité koncentrace - (K1) kontrolní (pre-imunní) protilátka a slepičí protilátka (1): 9  $\mu\text{g/ml}$  a 90  $\mu\text{g/ml}$  [96]; antigeny: 4  $\mu\text{g/ml}$ ; MA-BSA: maleylovaný derivát BSA, OVA: ovalbumin, FOS: fosvitin

## 4.2. Purifikace slepičích protilátek

Tato část práce je zaměřena na afinitní purifikaci slepičí protilátky-(1) a kontrolní (pre-imunní) protilátky-(K1). Připravená slepičí protilátka je polyklonálního charakteru vznikající jako heterogenní imunitní odpověď mnoha buněčných linií B-lymfocytů. Každá takováto linie pak produkuje protilátku, rozeznávající jiný epitop na původním antigenu. Imobilizací vhodného antigenu na CNBr-Sepharosu je tak možné z této komplexní směsi purifikovat protilátky rozeznávající tento konkrétní antigen a následně tuto adsorbovanou protilátku z kolony vymýt.

Pro ověření zda v této komplexní směsi protilátek se nachází protilátky rozeznávající fosforylovaný serinový zbytek, byl na Sepharosu navázán  $\alpha$ -kasein. Jako druhý afinitní nosič byl připraven imobilizovaný BSA pro odstranění protilátek, které by případně rozeznávaly tento protein a tudíž pro potlačení interakce jak s BSA tak s jeho maleylovaným derivátem (MA-BSA). Dále pro osvětlení vyšší interakce s maleylovaným derivátem BSA, zda nevzniká imunitní odpověď proti maleylovému zbytku při konstrukci imunogenu. Tato data mohou následně posloužit k návrhu nového imunogenu.

### 4.2.1. Imobilizace $\alpha$ -kaseinu na CNBr-aktivovanou Sepharosu

Na CNBr-aktivovanou Sepharosu 4B (2,5 ml nabobtnalého gelu) byl imobilizován  $\alpha$ -kasein (50 mg) podle postupu doporučeným výrobcem. Bylo přibližně určeno (z měření absorbance při 280 nm) množství navázaného  $\alpha$ -kaseinu: 36,4 mg na 2,5 ml gelu. Pro separaci slepičích protilátek byly naplněny dvě kolony (15 x 0,5 cm, 0,5 ml gelu).

#### 4.2.1.1. Afinity purifikace slepičích protilátek na sloupci Sepharosy s navázaným $\alpha$ -kaseinem

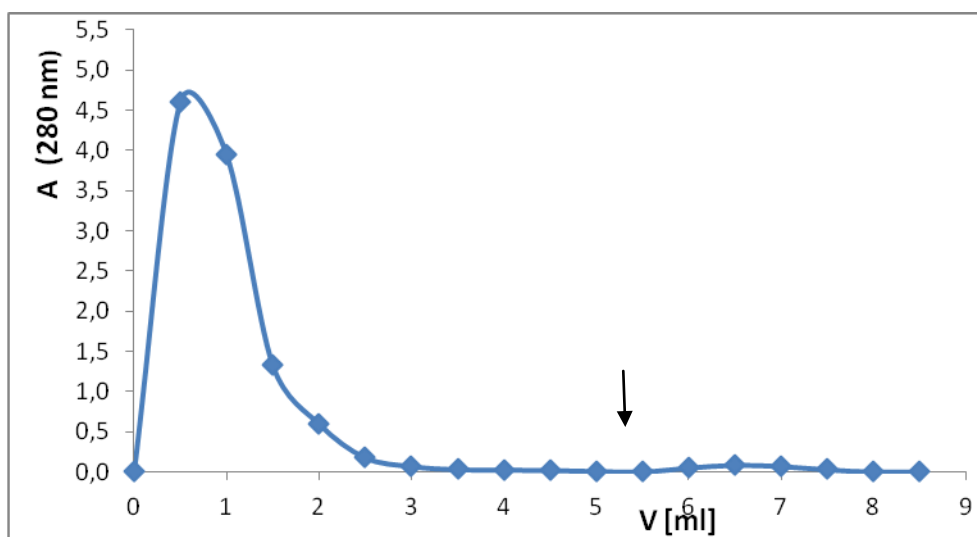
Proteinová frakce získaná z vaječných žloutků před (kontrolní (pre-imunní) protilátky-K1)) a po imunizaci (protilátky-1) slepic pomocí BSA byly separovány afinity chromatografií na sloupci Sepharosy s imobilizovaným  $\alpha$ -kaseinem. Byly získány dvě frakce protilátek: (i) frakce, která se na sloupec Sepharosy s imobilizovaným  $\alpha$ -kaseinem neadsorbovala a byla vymyta TBS (0,05M Tris/HCl, pH 7,4 obsahujícího 0,15 M NaCl) a (ii) frakce proteinů interagující s ligandem, která byla eluována 0,05 M diethylaminem (pH 11). Frakce eluované roztokem diethylaminu byly jímány do zkumavek obsahujících 1 M citrátový pufr, pH 6,5. Eluční frakce s nejvyšší absorbancí při 280 nm byly spojeny a byla určena přibližná koncentrace proteinů měřením absorpance při 280 nm. Obsah proteinů ve spojených získaných frakcích je uveden v (tab. 3) a průběh afinity chromatografie je znázorněn na (obr. 10a, 10b) na následující stránce

Tab. 3

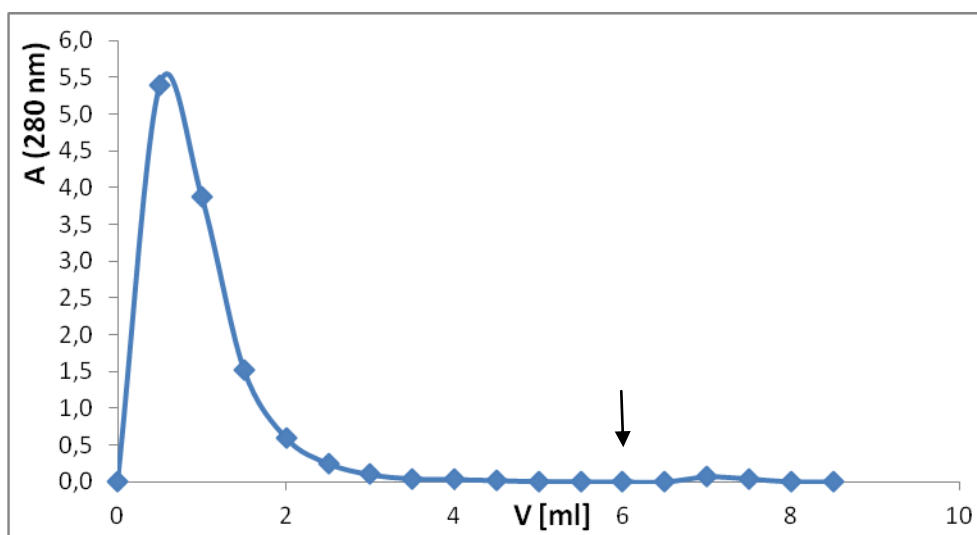
Chromatografie slepičí protilátky-(1) a kontrolní protilátky-(K1) na  $\alpha$ -kasein-Sepharose: koncentrace proteinů v získaných frakcích

Spojené frakce –protilátka-(1)	Protein [mg/ml]	Objem frakce [ml]
neadsorbovaná frakce	2,6	2
adsorbovaná frakce	0,07	2,1
Spojené frakce -kontrolní protilátka-(K1)	Protein [mg/ml]	Objem frakce [ml]
neadsorbovaná frakce	2,7	2
adsorbovaná frakce	0,05	1,4

(a)



(b)



**Obr. 10**

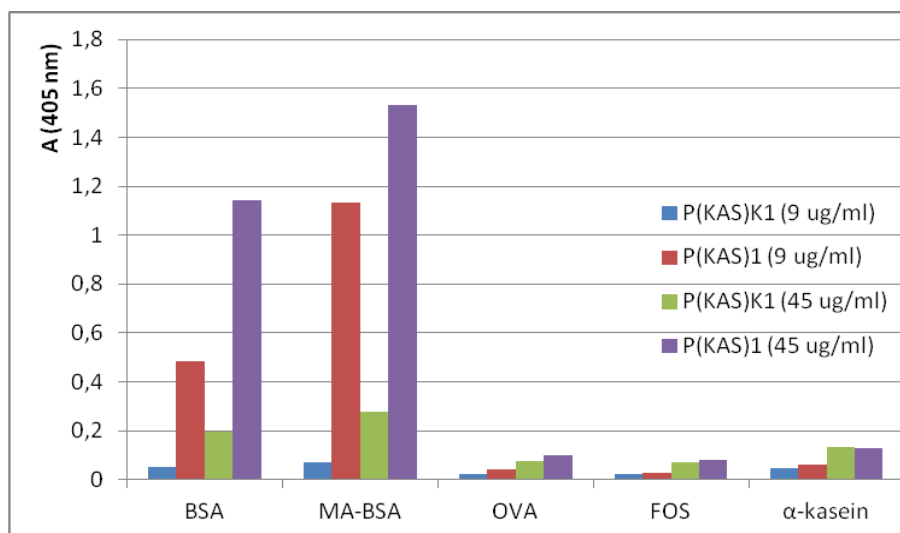
**Afinitní purifikace slepičí protilátky-(1) (a) a kontrolní (pre-imunní) protilátky-(K1) (b) na imobilizovaném  $\alpha$ -kaseinu**

roztok slepičí protilátky-(1) obr. (a) a kontrolní protilátky-(K1) obr. (b) zředěný pomocí TBS (0,05M Tris/HCl pufru, pH 7,4 obsahujícího 0,15 M NaCl) v poměru 1:1 (0,5 ml) byl smíchán s  $\alpha$ -kasein-Sepharosou (0,5 ml); po inkubaci přes noc byl gel přenesen do kolony (15 x 0,5 cm) a promýván TBS (neadsorbovaná frakce) a poté 0,05 M diethylaminem, pH 11 (adsorbovaná frakce; šipka označuje začátek eluce 0,05 M diethylaminem)

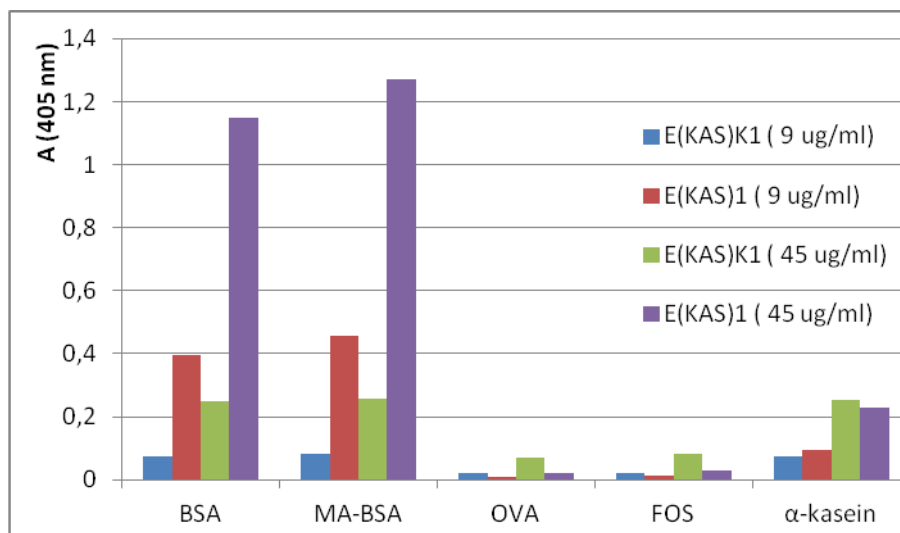
#### 4.2.1.2. ELISA test: ověření specifity frakcí protilátek získaných afinitní chromatografií na $\alpha$ -kasein-Sepharose

Na destičku MaxiSorp<sup>TM</sup> s plochým dnem (F) byly naneseny následující antigeny: ovalbumin, fosvitin,  $\alpha$ -kasein, BSA a maleylovaný BSA. Výsledky testu jsou shrnuty na (obr. 11a, 11b)

(a)



(b)



**Obr. 11**

**ELISA test – ověření specifity frakcí protilátek neadsorbovaných (a) a adsorbovaných (b) na  $\alpha$ -kasein-Sepharosu:**

použité koncentrace - P(KAS)K1 (kontrolní protilátka-K1) neadsorbovaná na afinitní nosič a P(KAS)1 (protilátka-1) neadsorbovaná na afinitní nosič, E(KAS)K1 (kontrolní protilátka-K1) adsorbovaná na afinitní nosič a E(KAS)1 (protilátka-1) adsorbovaná na afinitní nosič: 9  $\mu\text{g/ml}$  a 45  $\mu\text{g/ml}$ ); MA-BSA: maleylovaný BSA, OVA: ovalbumin, FOS: osvitin a  $\alpha$ -kasein: 4  $\mu\text{g/ml}$ .

Porovnáním získaných dat je patrné, že interakce BSA a jeho maleylovaného derivátu s protilátkami neadsorbovanými a adsorbovanými na imobilizovaný  $\alpha$ -kasein se výrazně nelišily. Afinitní chromatografie na  $\alpha$ -kasein-Sepharose však také neprokázala žádné obohacení adsorbované frakce protilátkou interagující s  $\alpha$ -kaseinem. Je zřejmé, že v adsorbované frakci takovéto protilátky přítomny nejsou. Tomu nasvědčuje i malé množství adsorbovaných proteinů při afinitní chromatografii na imobilizovaném  $\alpha$ -kaseinu (obr. 10a, 10b).

#### **4.2.2. Afinitní purifikace slepičích protilátek na sloupci Sepharosy s imobilizovaným hovězím sérovým albuminem**

V této části práce bylo zjišťováno, zda slepičí protilátky vytvořené po imunizaci slepice připraveným imunogenem (separovaná směs fosfopeptidů  $\alpha$ -kaseinu vázaná na maleylový derivát BSA) obsahují protilátky proti jednotlivým částem antigenu, konkrétně BSA a jeho maleylovanému derivátu v případě, že se v séru takovéto protilátky rozeznávají určitý epitop na BSA a jeho maleylovaném derivátu nachází, pokusit se takovéto protilátky izolovat. Dále ověřit hypotézu, zda jsou přítomny protilátky rozeznávající pouhý maleylovaný zbytek.

##### **4.2.2.1. Imobilizace hovězího serového albuminu na CNBr-aktivovanou Sepharosu**

Na CNBr-aktivovanou Sepharosu 4B (2,5 ml nabobtnalého gelu) byl imobilizován BSA (50 mg) obdobným způsobem jako v případě imobilizace  $\alpha$ -kaseinu (kap. 4.2.1) podle postupu doporučeným výrobcem. Bylo přibližně určeno (z měření



absorbance při 280 nm) množství navázaného BSA: 31 mg na 2,5 ml gelu. Pro separaci slepičích protilátek byly naplněny dvě kolony (15 x 0,5 cm, 0,5 ml gelu).

#### 4.2.2.2. Afinity purifikace slepičích protilátek na sloupci Sepharosy s imobilizovaným hovězím sérovým albuminem

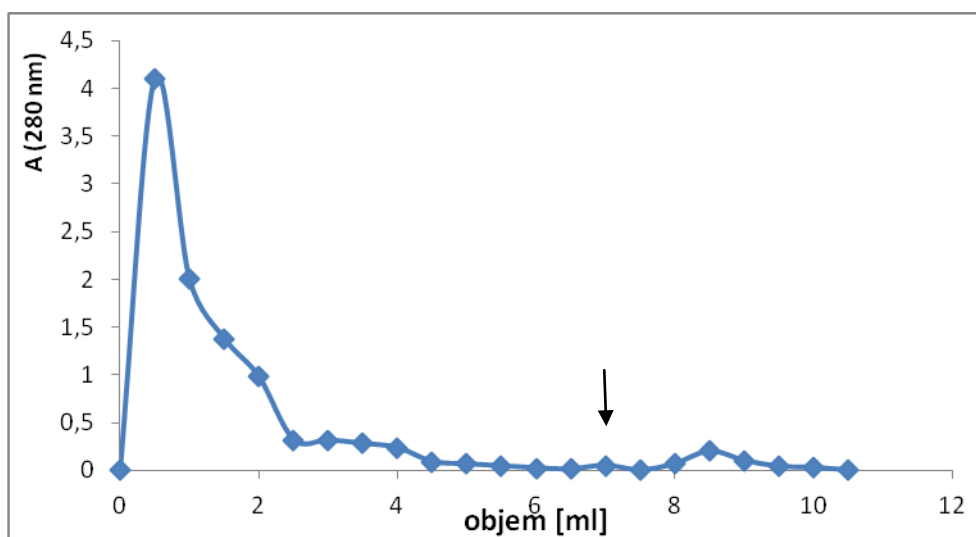
Obdobným způsobem jako v případě afinity chromatografie na imobilizovaném  $\alpha$ -kaseinu byly separovány proteinové frakce získané z vaječných žloutků před (kontrolní (pre-imunní) protilátky-K1) a po imunizaci (protilátky-1) slepice připraveným imunogenem. Afinity chromatografií na BSA-Sepharose byly získány dvě frakce protilátek: (i) frakce, která se na sloupec Sepharosy s imobilizovaným BSA neadsorbovala a byla vymyta TBS (0,05M Tris/HCl, pH 7,4 obsahujícího 0,15 M NaCl) a (ii) frakce proteinů interagující s imobilizovaným proteinem, která byla eluována 0,05 M diethylaminem, pH 11. Frakce eluované roztokem diethylaminu byly jímány do zkumavek obsahujících 1 M citrátový pufr, pH 6,5. Eluční frakce s nejvyšší absorbancí při 280 nm byly spojeny a byla určena přibližná koncentrace proteinů. Obsah proteinů ve spojených získaných frakcích je uveden v (tab. 4). Průběh afinity chromatografie je pak znázorněn na (obr. 12a, 12b) na následující stránce.

Tab. 4

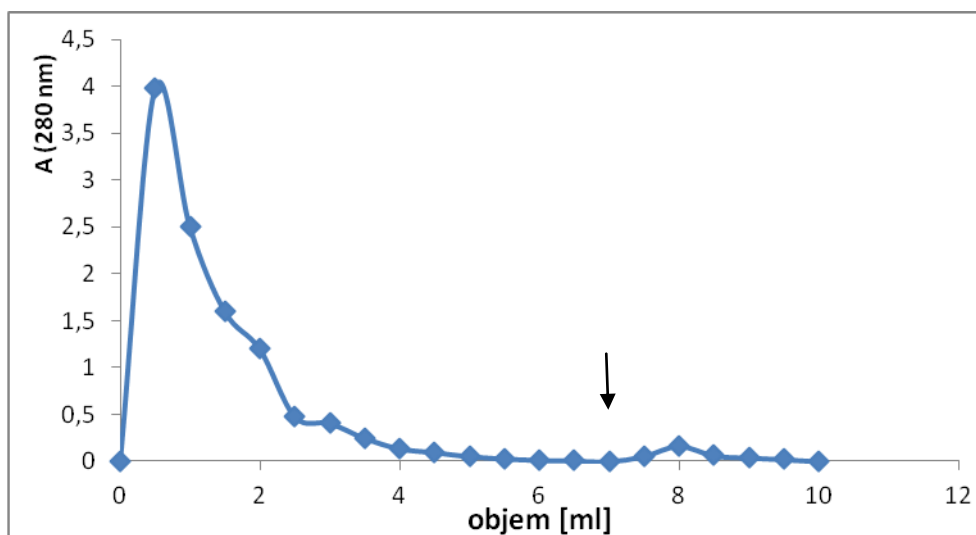
Chromatografie slepičí protilátky-(1) a kontrolní protilátky-(K1) na BSA-Sepharose: koncentrace proteinů v získaných frakcích

Spojené frakce - protilátka (1)	Protein [mg/ml]	Objem frakce [ml]
neadsorbovaná frakce	2,4	2
adsorbovaná frakce	0,33	2,1
Spojené frakce kontrolní protilátka (K1)	Proteinu [mg/ml]	Objem frakce [ml]
neadsorbovaná frakce	2,6	2
adsorbovaná frakce	0,26	2,1

(a)



(b)



**Obr. 12**

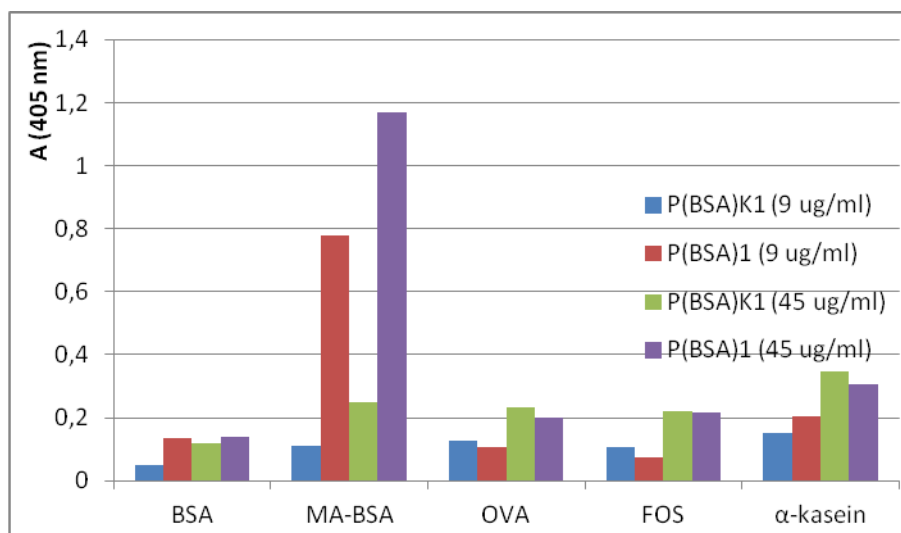
**Afinitní purifikace slepičí protilátky-(1) (a) a kontrolní (pre-imunní) protilátky-(K1) (b) na BSA-Sepharose**

roztok slepičích imunoglobulinů-(1) a) a kontrolních imunoglobulinů-(K1) b) zředěný pomocí TBS (0,05M Tris/HCl, obsahujícího 0,15 M NaCl) v poměru 1:1 (0,5 ml) byl smíchán s BSA-Sepharosou (0,5 ml); po inkubaci přes noc byl gel přenesen do kolony (15x 0,5 cm) a promýván TBS (neadsorbovaná frakce) a poté 0,05 M diethylaminem (pH 11) (adsorbovaná frakce); šipka označuje začátek eluce 0,05 M diethylaminem.

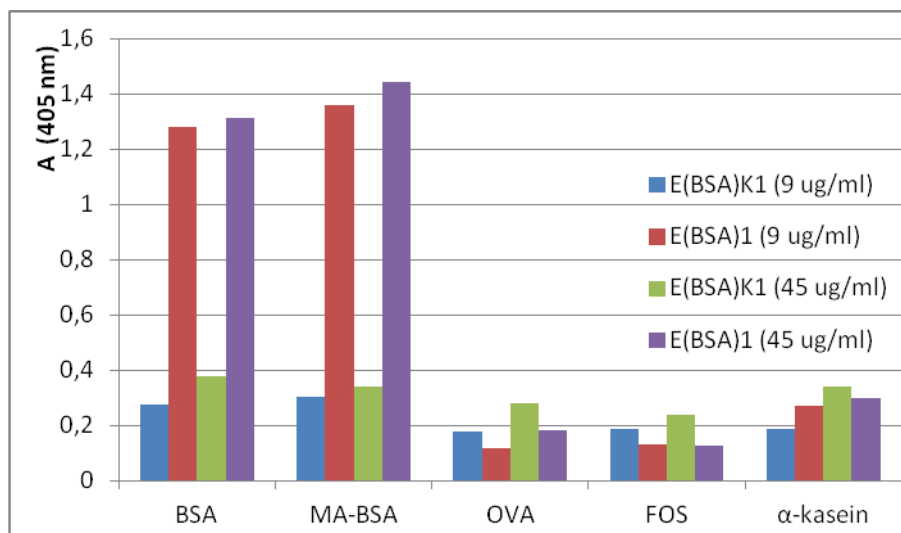
#### 4.2.2.3. ELISA test: ověření specifity frakcí protilátek získaných afinitní chromatografií na BSA-Sepharse

Na destičku MaxiSorp™ s plochým dnem (F) byly naneseny následující antigeny: ovalbumin, fosvitin,  $\alpha$ -kasein, BSA a maleylovaný BSA. Výsledky ELISA testu jsou shrnuty v (obr. 13a, 13b)

(a)



b)



**Obr. 13**

**ELISA test – ověření specifity frakcí protilátek nedsorbovaných (a) a adsorbovaných (b) na BSA-Sepharsu**

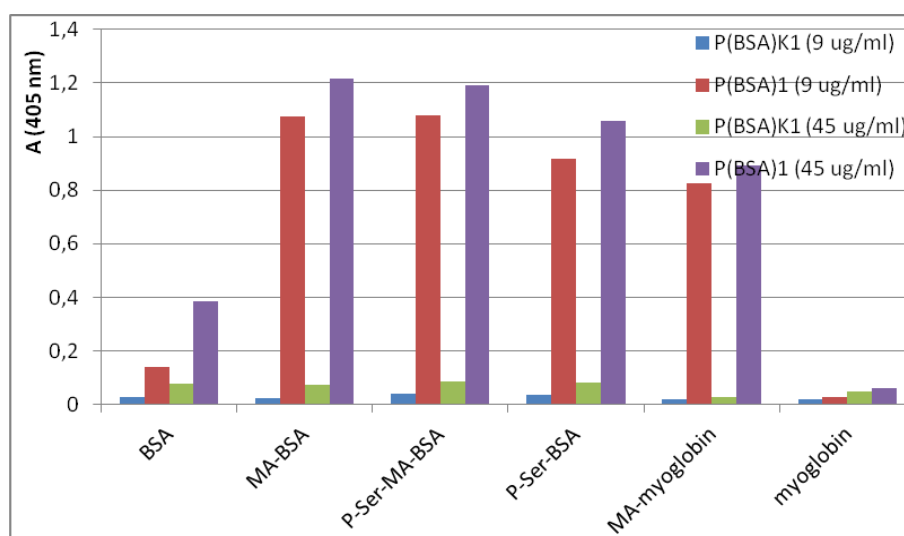
použité koncentrace - P(BSA)K1 (kontrolní protilátka-K1) neadsorbovaná na afinitní nosič a P(BSA)1 (protilátka-1) neadsorbovaná na afinitní nosič, E(BSA)K1 (kontrolní protilátka-K1) adsorbovaná na afinitní nosič a E(BSA)1 (protilátka-1) adsorbovaná na afinitní nosič: 9 µg/ml a 45 µg/ml); MA-BSA: maleylovaný BSA, OVA: ovalbumin, FOS: fosvitin a  $\alpha$ -kasein: 4 µg/ml.

Porovnání interakce frakcí slepičích protilátek získaných při afinitní chromatografii na BSA-Sepharose, (obr 13a, 13b) ukázalo zajímavé skutečnosti: slepičí protilátky (1) obsahují protilátky specifické proti BSA, které je možné separovat afinitní chromatografií na imobilizovaném BSA; frakce slepičích protilátek neadsorbovaných na BSA-Sepharosu však silně interagovala s maleylovaným derivátem BSA. Získané výsledky naznačují, že frakce slepičích protilátek neadsorbovaná na BSA-Sepharosu obsahuje protilátky specifické proti modifikujícímu řetězci vázaném na BSA (po modifikaci lysinových zbytků proteinu maleinanhydridem). Separace slepičí protilátky (1) pomocí afinitní chromatografie na BSA-Sepharose neměla vliv na slabou interakci připravených protilátek s modelovými fosfoproteiny, která byla detekovatelná i u frakcí kontrolních protilátek-(K1).

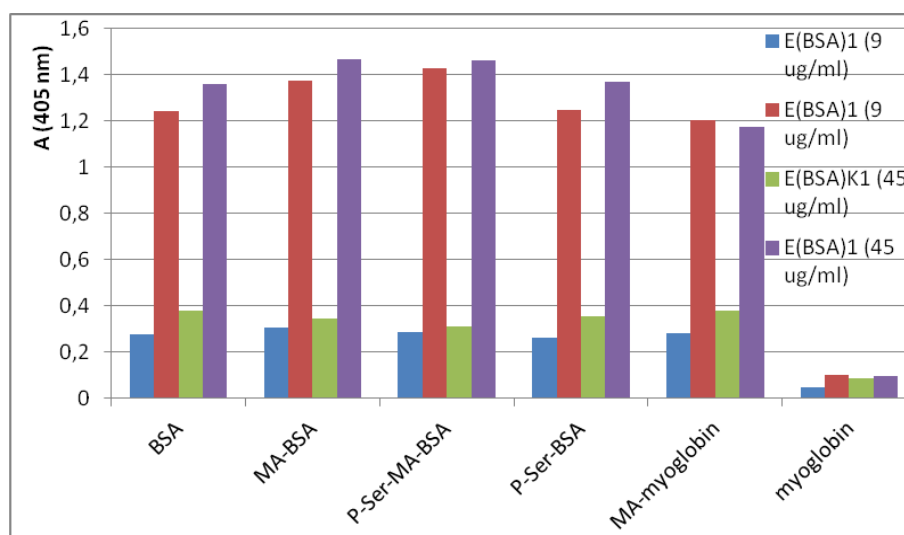
#### **4.2.2.4. ELISA test: interakce frakcí slepičí protilátek získaných chromatografií na BSA-Sepharose s modelovými modifikovanými proteiny**

Na destičku MaxiSorp<sup>TM</sup> s plochým dnem (F) byly naneseny následující antigeny: BSA, maleylovaný BSA, fosforyl-O-L-serin vázaný na maleylovaný BSA, fosforyl-O-L-serin vázaná karbodiimidovou reakcí přímo na BSA, myoglobin a jeho maleylovaný derivát. V této části práce byl sledován vliv přítomnosti maleinylového řetězce vázaného v molekule proteinu na specifitu protilátek. Maleinylace nebo sukcinylace nosného proteinu se používá při vazbě antigenů při přípravě imunogenů. K testování byl použit myoglobin, který není fosfoprotein, a jeho maleylovaný derivát. Výsledky ELISA testů jsou shrnuty na (obr. 14a, 14b)

(a)



(b)



**Obr. 14**

**ELISA test – ověření specifity frakcí protilátek neadsorbovaných (a) a adsorbovaných (b) na BSA-Sepharosu při použití modelových proteinů a jejich derivátů**

použité koncentrace - P(BSA)K1 (kontrolní protilátka-K1) neadsorbovaná na afinitní nosič a P(BSA)1 (protilátka-1) neadsorbovaná na afinitní nosič, E(BSA)K1 (kontrolní protilátka-K1) adsorbovaná na afinitní nosič a E(BSA)1 (protilátka-1) adsorbovaná na afinitní nosič: 9  $\mu\text{g/ml}$  a 45  $\mu\text{g/ml}$ ; MA-BSA- maleylovaný BSA, P-Ser-MA-BSA: fosforyl-O-L-serin vázaný na maleylovaný BSA, P-Ser-BSA: fosforyl-O-L-serin:

vázaný karbodiimidovou reakcí přímo na BSA, MA-myoglobin: maleylovaný myoglobin: 4 µg/ml.

Získané výsledky uvedené na (obr. 14a, 14b) ukazují, že slepičí protilátky připravené imunizací antigenem vázaným na maleylovaný nosný protein rozpoznávají přítomnost maleinylového řetězce vázaného na molekule proteinu. Vedle silné interakce s maleylovaným BSA, slepičí protilátky interagovaly i s myoglobinem modifikovaným stejným způsobem, zatímco s nemodifikovaným myoglobinem interagovaly nepatrně. Je zajímavé, že rozdíl v interakci slepičích protilátek, které se na BSA-Sepharosu neadsorbovaly s P-serinem vázaným na maleylovaný (P-Ser-MA-BSA) a nemaleylovaný BSA (P-Ser-BSA) nebyl příliš výrazný. Žádný signifikantní rozdíl nebyl pozorován mezi interakcí obou frakcí slepičích protilátek s MA-BSA a P-Ser-MA-BSA, což ukazuje, že připravené protilátky vázaný zbytek fosforyl-O-L-serinu nerozpoznávají. Zajímavý je však pozorovaný rozdíl v interakci slepičí protilátky, která se na BSA neadsorbovala s BSA a P-Ser-BSA (fosforyl-O-serin vázán přímo).

## 5. Diskuse

Fosforylace proteinů patří mezi jedny z nejvíce studovaných posttranslačních modifikací protein. Identifikace fosforylačních míst přináší informace nejenom o funkci proteinů ale, používá se také pro studium fosforylace a defosforylace těchto látek v souvislosti se závažnými onemocněními a z toho vyplývá zvýšený zájem o jejich detekci jako specifických bio-markerů pro některá onemocnění.

Studium fosforylace proteinů je komplikováno a limitováno řadou faktorů, které se týkají samotného procesu modifikace in vivo a jednak i metod, které se ke studiu používají. Řada fosfoproteinů se účastní regulačních mechanismů a jejich množství se mění v čase působením fosfatas a protein kinas. Druhou komplikací je, že se vyskytují v malém množství vedle mnohem většího množství stejného nemodifikovaného proteinu. I přes velký pokrok, který přineslo využívání MS analýzy pro konečnou identifikaci fosfoproteinů, ukazuje se, že je nutno používat separaci (obohacení) ať již fosfoproteinů nebo fosfopeptidů (po proteolytickém štěpení), která předchází konečné analýze.

Imunochemické metody představují jednu z technik užívaných pro separaci fosfoproteinů nebo fosfopeptidů ze směsi s nefosforylovanými proteiny. Důležitou vlastností při použití imunochemických metod je selektivita a afinita použitých protilátek, jinak může být detekováno velké množství „falešně pozitivních odpovědí“, které výrazně snižují použitelnost této metody [9, 65].

Pokud necháme stranou protilátky generované proti konkrétnímu peptidu, obsahujícímu fosforylovaný aminokyselinový zbytek studovaného proteinu (tzv. angl. phospho-site specific antibodies) [73, 74] použití fosfospecifických protilátek připravených proti imunogenům obsahujícím P-serin, P-threonin nebo P-tyrosin je limitováno jejich selektivitou. V mnoha pracích již byly úspěšně použity protilátky specifické proti P-tyrosinu k separaci proteinů fosforylovaných na tyrosinových zbytcích [58, 59, 60, 61] nebo fosfopeptidů obsahujícím P-tyrosin [62, 63, 64]. Spolehlivé protilátky specifické pro P-serin a P-threonin však stále nejsou běžně dostupné [9]. Protilátky specifické pro P-serin a P-threonin totiž velmi často rozpoznávají celý sekvenční motiv obklopující fosforylovaný aminokyselinový zbytek, proto jsou schopné interagovat pouze s některými fosfoproteiny [65].

Úkolem diplomové práce bylo připravit nový typ imunogenu pro přípravu slepičích protilátek, které by rozpoznávaly O-fosforylované serinové zbytky fosfoproteinů a které by bylo možné obecněji využít ve fosfoproteomických studiích. Na rozdíl od předcházející studie [96], ve které byly slepice imunizovány fosforyl-O-L-serinem navázaným na maleylovaný KLH.

Nový typ imunogenu byl připraven navázáním separované frakce fosfopeptidů  $\alpha$ -kaseinu na maleylovaný derivát hovězího sérového albuminu. Tyto dva imunogeny se lišily nejen nosným proteinem ale i haptenem.

Fosfospecifické protilátky jsou nabízeny řadou firem; jedná se většinou o králičí nebo myší protilátky generované nejčastěji fosforylovanými aminokyselinami (L-serin, L-threonin nebo L-tyrosin) vázanými na KLH nebo hovězí sérový albumin nebo syntetickými peptidy obsahujícími fosforylovaný aminokyselinový zbytek. Pokud je nám známo, pouze jediná firma (Boston Express Laboratory (Quincy, USA) [92]. Tato firma nabízí fosfospecifické slepičí protilátky, kde jako imunogen byla použita konkrétní fosforylovaná aminokyselina konjugovaná s BSA. Použití slepičích protilátek v proteomických studiích má celou řadu předností: např. výhodou slepičích protilátek oproti protilátkám savců je, že příprava protilátek je prováděna neinvazivní technikou a to pouhým sběrem vajec imunizovaných.

Specifita získaných nepurifikovaných slepičích protilátek byla testována pomocí ELISA testů, modelových fosfoproteinů ( $\alpha$ -kasein, fosvitin, ovalbumin) a synteticky připravených antigenů (maleylovaný BSA, fosfopeptidová frakce  $\alpha$ -kaseinu, separovaná na Fe(III)-IDA-Sepharose, fosforyl-O-L-serin vázaný na maleylovaný BSA a fosforyl-O-L-serin vázaný přímo na BSA). Porovnáním výsledků ELISA testů vyplynulo, že nepurifikované kontrolní protilátky (získané od slepic před imunizací) a nepurifikované slepičí protilátky (po imunizaci) se podstatně nelišily v interakci jak s modelovými fosfoproteiny nebo připravenými antigeny obsahujícími P-serin. Zajímavé však bylo, že nepurifikované slepičí protilátky silně interagovaly s hovězím sérovým albuminem a ještě o něco více s jeho maleylovaným derivátem. U kontrolních protilátek interakce s těmito antigeny byla výrazně slabší.

V ELISA testech byla používána sekundární králičí protilátka proti slepičím protilátkám značená alkalickou fosfatase a jako substrát byl použit p-nitrofenylfosfát. K vyloučení možnosti, že by k vysokým interakcím slepičích protilátek s hovězím sérovým albuminem mohla přispívat esterasou aktivita sérového albuminu, popsaná v případě více druhů [104, 105, 106] včetně slepic [106, 107] byl ELISA test proveden



paralelně při použití sekundární protilátky proti slepičím protilátkám značené křenovou peroxidasou. Získané výsledky však byly obdobné jako v případě sekundární protilátky značené alkalickou fosfátasou a možnost ovlivnění hodnot charakterizujících interakci nepotvrdily.

Získané slepičí protilátky byly dále purifikovány na dvou afinitních nosičích: na  $\alpha$ -kasein-Sepharose a BSA-Sepharose. Vzhledem k tomu, že imunogen, kterým byly slepice imunizovány, obsahoval vázanou fosfopeptidovou frakci  $\alpha$ -kaseinu, měly by se přítomné protilátky specifické pro fosforylované serinové zbytky na imobilizovaný  $\alpha$ -kasein adsorbovat. Průběh afinitní chromatografie však ukázal, že na tento nosič se adsorbovalo jen velmi malé množství proteinů. Následné ELISA testy neprokázaly výrazné obohacení adsorbované frakce protilátek na imobilizovaný ligand protilátkami proti fosfoproteinům. Pouze v případě  $\alpha$ -kaseinu použitého jako antigenu, byla interakce vyšší ale i u kontrolních (pre-imunních) protilátek. Zajímavé bylo opět chování hovězího sérového albuminu a jeho maleylovaného derivátu. Silná interakce s těmito antigeny byla pozorována jak v případě frakce neadsorbované tak i adsorbované na  $\alpha$ -kasein-Sepharosu. Schopnost slepičí protilátky, která se na imobilizovaný  $\alpha$ -kasein adsorbovala, interagovat s hovězím sérovým albuminem a jeho derivátem pozorovala také T. Emmerová [96] i když v jejím případě protilátky byly získány imunizací slepic imunogenem, který neobsahoval BSA, ale KLH. Nicméně, důvod proč protilátky rozpoznávající hovězí sérový albumin se adsorbují na imobilizovaný  $\alpha$ -kasein je prozatím obtížné vysvětlit.

Druhým afinitním nosičem použitým k purifikaci získaných slepičích protilátek byl hovězí sérový albumin imobilizovaný na Sepharose. ELISA testy prokázaly, že slepičí protilátky, které rozpoznávaly hovězí sérový albumin, byly na afinitní nosič adsorbovány. Avšak frakce protilátek, která se na imobilizovaný hovězí sérový albumin neadsorbovala, výrazně interagovala s maleylovaným derivátem hovězího sérového albuminu. Získané výsledky ukazují na možnost, že tato frakce slepičích protilátek obsahuje protilátky specifické proti modifikujícímu řetězci vázanému na hovězím sérovém albuminu. Možnost, že slepičí protilátky rozpoznávají přítomnost maleinylového řetězce vázaného na molekule proteinu byla potvrzena v případě myoglobinu a jeho maleylovaného derivátu; zatímco obě frakce slepičích protilátek interagovaly s myoglobinem nepatrně, silná interakce však byla pozorována v případě jeho maleylovaného derivátu.

Získané výsledky představují další krok v řešení přístupu separace fosfoproteinů pomocí slepičích protilátek specifických pro P-serin. Slepičí protilátky byly vybrány pro možnost jejich získání ve větším množství ve srovnání např. s králíčími. Pokud by se podařilo připravit vhodné slepičí fosfospecifické protilátky, bylo by velmi výhodné je pak imobilizovat např. na magnetické „kuličky“. Spojení immunoafinitní a magnetické separace představuje perspektivní separační techniku. V případě fosfospecifických protilátek byl takový postup popsán, pokud je nám známo, pouze jednou [67]. Protilátky specifické pro P-tyrosin byly imobilizovány na magnetické částice s navázaným proteinem G (ten interaguje s Fc částmi protilátek) a takto modifikované magnetické částice byly úspěšně použity k separaci fosfopeptidů z proteolytické směsi nefosforylovaných peptidů.

Pomocí připraveného antigenu obsahujícího vázanou fosfopeptidovou frakci  $\alpha$ -kaseinu na hovězí sérový albumin se nepodařilo připravit protilátky, které by rozeznávaly fosforyl-O-L-serinové zbytky přítomné v modelových fosfoproteinech nebo synteticky připravených antigenech.

K vyřešení tohoto problému je třeba zvolit jiný typ imunogenu. Další studie bude třeba zaměřit na metody přípravy syntetických antigenů jak pro imunizaci zvířat, tak pro přípravu modelových fosfoproteinů pro ELISA testy, s definovaným obsahem fosfoserinových zbytků.

## 6. Závěr

Byl připraven nový typ imunogenu pro přípravu slepičích protilátek specifických pro O-fosforylované aminokyselinové zbytky fosfoproteinů: směs fosfopeptidů  $\alpha$ -kaseinu imobilizovaná na maleylovaný derivát hovězího serového albuminu. Pro separaci fosfopeptidů  $\alpha$ -kaseinu ze směsi peptidů po štěpení proteinu trypsinem byla použita afinitní chromatografie na imobilizovaných Fe(III) iontech (Fe(III)-IDA-Sepharosa). Separovaná frakce fosfopeptidů  $\alpha$ -kaseinu byla navázána na maleylovaný derivát hovězího sérového albuminu. Přítomnost navázaných fosfopeptidů byla prokázána pomocí MALDI-TOF MS analýzy.

Po imunizaci slepic připraveným imunogenem, byla ze žloutků izolována imunoglobulinová frakce, která dále byla purifikována pomocí afinitní chromatografie na  $\alpha$ -kasein-Sepharose a na hovězím sérovém albuminu imobilizovaném na Sepharose.

Pro studium specifity slepičích protilátek a jejich frakcí získaných afinitní chromatografií byly připraveny syntetické deriváty: maleylovaný myoglobin a hovězí sérový albumin, dále fosforyl-O-L-serin vázaný karbodiimidovou reakcí buď přímo na hovězí sérový albumin nebo na jeho maleylovaný derivát.

Specifita získaných protilátek byla testována pomocí ELISA testů. Bylo zjištěno, že připravené slepičí protilátky, ani jejich frakce po afinitní chromatografii na  $\alpha$ -kasein-Sepharose, fosforyl-O-L-serinový zbytek v modelových fosfoproteinech ( $\alpha$ -kasein, fosvitin, ovalbumin) ani v synteticky připravených derivátech hovězího sérového albuminu nerozpoznávají.

Pomocí synteticky připravených antigenů bylo prokázáno (maleinylované deriváty hovězího sérového albuminu a myoglobinu), že slepičí protilátky připravené imunizací antigenem obsahujícím fosforyl-O-L-serinový zbytky, které jsou vázány na maleylovaný nosný protein, rozpoznávají přítomnost maleinylového řetězce vázaného na molekule proteinu.

## **7. Seznam použité literatury:**

- [1] Fischer E. H., Krebs E. G.: J. Biol. Chem., 216, 121–132, (1955)
- [2] Sutherland E. W., Wosilait W. Y.: Nature, 175, 169-170, (1955)
- [3] Pyerin W., Taniguchi H.: EMBO J., 8, 3003-3010, (1989)
- [4] Martinez A., Haavik J., Flatmark T., Arrondo J. L., Muga A.: J. Biol. Chem., 271, 19737-19742, (1996)
- [5] Arena S., Benvenuti S., Bardelli A.: Cell Mol. Life Sci., 62, 2092-2099, (2005)
- [6] Cohen P.: Eur. J. Biochem., 268, 5001-5010, (2001)
- [7] Leitner. A, Sturm M., Lindner W.: Anal. Chim. Acta, 703, 19-30, (2011)
- [8] Grimsrud P. A., Swaney D. L., Wenger C., Beauchene N. A, Coon J. J.: ASC Chem. Biol. , 5, 105-119, (2010)
- [9] Raggiaschi R., Gotta S., Terstappen G. C.: Biosci. Rep., 25, 33-44 (2005)
- [10] Halada P.: Chem. Listy, 99, 922-929, (2005)
- [11] Steeg P., Palmieri D., Ouatas T., Selmo M.: Cancer Lett., 190, 1-12, (2003)
- [12] Sickmann A., Meyer H. E.: Proteomics, 1, 200-206, (2001)
- [13] Yan J. X., Packer N. H., Gooley A. A., Williams K. L.: J. Chromatogr. A, 808 23-41, (1998)
- [14] Ubersax J. A., Ferrell J. E. Jr.: Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 8, 530-541, (2007)
- [15] Dhanasekaran N., Premkumar Reddy E.: Oncogene, 17, 1447-1455, (1998)
- [16] Manning G., Whyte D. B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S.: Science, 298, 1912-1934, (2002)
- [17] Tinghlom T. E, Jensen O. E., Martin R. L.: Proteomics, 9, 1451–1468, (2009)
- [18] Guy G. R., Philip R., Tan Y. H.: Electrophoresis, 15, 417–440, (1994)
- [19] Steinberg T. H., Agnew B. J., Gee K. R., Leung W. Y., Goodman T., Schulenberg B., Hendrickson J., Beechem J. M., Haugland R. P., and Patton W. F.: Proteomics, 3, 1128–1144, (2003)

- [20] Schulenberg B., Aggeler R., Beechem J. M., Capaldi R. A., and Patton W. F.: *J. Biol. Chem.*, 278, 27251–27255, (2003)
- [21] Yamagata A., Kristensen D. B., Takeda Y., Miyamoto Y., Okada K., Inamatsu M., Yoshizato K.: *Proteomics*, 2, 1267–1276, (2002)
- [22] Towbin H., Staehelin T., and Gordon J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350–4354, (1979)
- [23] Magi B., Bini L., Marzocchi B., Liberatori S., Raggiaschi R., Pallini V. (1999). *Methods Mol. Biol.*, 112, 431–443,(1999)
- [24] Kaufmann H., Bailey J. E., Fussenegger M.: *Proteomics*, 1, 194–199, (2001)
- [25] Grønborg M., Kristiansen T. Z., Stensballe A., Andersen J. S., Ohara O., Mann M., Jensen O. N., Pandey A. *Mol. Cell. Proteomics*, 1, 517–527, (2002)
- [26] Godovac-Zimmermann J., Soskic V., Poznanovic S., Brianza F.: *Electrophoresis*, 20, 952–961, (1999)
- [27] Soskic V., Gorlach M., Poznanovic S., Boehmer F. D., Godovac-Zimmermann J.: *Biochemistry* 38, 1757–1764, (1999)
- [27] Kitazawa T., Eto M., Woodsome T. P., Brautigan D. L.: *J. Biol. Chem.*, 275, 9897–9900, (2000)
- [28] Wang Z., Dong G., Singh S., Steen H., Li J.: *J. Proteomics*, 72, 21, 831-835, (2009)
- [29] Gembitsky, D. S., Lawlor K., Jacovina A., Yaneva M., Tempst P. : *Mol. Cell Proteomics*, 3, 1102–1118, (2004)
- [30] Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G.: *Nature*, 258, 598-599, (1975)
- [31] Andersson, L., Porath, J.: *Anal. Biochem.*, 154, 250–254, (1986)
- [32] Gong B., Bo Ch., Wang F.: *Chin. J. Chem.*, 28, 1171–1176, (2010)
- [33] Chen H. M., Ho C. W., Liu J. W., Lin K. Y., Wang Y. T., Lu Ch., Liu H. L.: *Biotechnol. Prog.*, 19, 864-73, (2003)
- [34] Posewitz M. C., Tempst P.: *Anal. Chem.*, 71, 2883–2892, (1999)
- [35] Feng S., Ye M. L., Zhou H. J., Jiang X. G., Jiang X. N., Zou H. F., Gong B.: *Mol. Cell Proteomics*, 6, 1656–1665, (2007)
- [36] Yu Z., Han G., Sun S., Jiang X., Chen R., Wang F., Wu R., Ye M., Zou H.: *Anal. Chim. Acta*, 636, 34–41, (2009)
- [37] Chaga G. S.: *J. Biochem. Biophys. Methods*, 49, 313–334, (2001)

- [38] Sykora C., Hoffman R., Hoffman P.: *Protein Pept. Lett.*, 14, 489-496, (2007)
- [39] Ficarro S. B., McClelland M. L., Stukenberg P. T., Burke D. J., Ross M. M., Shabanowitz J., Hunt D. F., White F. M.: *Nat. Biotechnol.*, 20, 301–305, (2002)
- [40] Tan F., Zhang Y., Mi W., Wang J., Wei J., Cai Y., Qian X.: *J. Proteome Res.*, 7, 1078-87, (2008)
- [41] Prikryl P., Horak D., Ticha M. Kucerova Z.: *J. Sep. Sci.*, 29, 2541–2549, (2006)
- [42] L. Novotna, T. Emmerova, D. Horak, Z. Kucerova, M. Ticha, *J. Chromatogr. A*, 1217, 8032-8040, (2010)
- [43] Matsuda H., Nakamura H., Nakajima T.: *Anal. Sci.*, 6, 911-912, (1990)
- [44] Pinkse M. W., Uitto P. M., Hilhorst M. J., Ooms B., Heck A. J.: *Anal. Chem.*, 76, 3935-3943, (2004)
- [45] Sano A., Nakamura H.: *Anal. Sci.*, 20, 565-566, (2004)
- [46] Simon E. S., Young M., Chan A., Bao Z. Q., Andrews P. C.: *Anal. Biochem.*, 377, 234-242, (2008)
- [47] Larsen M. R., Thingholm T. E., Jensen O. N., Roepstorff P., Jorgensen T. J.: *Mol. Cell Proteomics*, 4, 873-886, (2005)
- [48] Kweon H. K., Hakansson K.: *Anal. Chem.*, 78, 1743-1749, (2006)
- [49] Zhou H. J., Tian R. J., Ye M. L., Xu S. Y., Feng S., Pan C. S., Jiang X. G., Li X., Zou H. F.: *Electrophoresis*, 28, 2201-2215, (2007)
- [50] Han L., Shan Z., Chen D., Yu X., Yang P., Tu B., Zhao D.: *J. Colloid Interface Sci.*, 318, 315-321, (2008)
- [51] Li Y., Liu Y., Tang J., Lin H., Yao N., Shen X., Deng C., Yang P., Zhang X.: *J. Chromatogr. A*, 1172, 57-71, (2007)
- [52] Ficarro S. B., Parikh J. R., Blank N. C., Marto J. A.: *Anal. Chem.*, 80, 4606-4613, (2008)
- [53] Chalmers M. J., Kolch W., Emmet M. R., Marshall A. G., Mischak H.: *J Chromatogr.*, 803, 111–120, (2004)
- [54] Jaffe H., Veeranna, Pant H. C.: *Biochemistry*, 46, 16211–16224, (1998)
- [55] Oda Y., Nagasu T., Chait B. T.: *Nat. Biotechnol.*, 19, 379–382, (2001)
- [56] Tseng H. C., Ovaa H., Wei N. J., Ploegh H., Tsai L. H.: *Chem. Biol.*, 12, 769–777, (2005)

- [57] Goshe M. B.: *Brief Funct. Genomic. Proteomic.*, 4, 363–376, (2007)
- [58] Imam-Sghiouar N., Laude-Lemaire I., Labas V., Pflieger D., Le Caer J. P., Caron M., Nabias D. K., Joubert-Caron R.: *Proteomics*, 2, 828–838, (2002)
- [59] Pandey A., Podtelejnikov A. V., Blagoev B., Bustelo X. R., Mann M., Lodish H. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97, 179–184, (2000)
- [60] Ficarro S. B., Chertihin O. A., Westbrook V. A., White F., Jayes F., Kalab P., Marto J. A., Shabanowitz J., Herr J. C., Hunt D. F., Visconti P. E.: *J. Biol. Chem.*, 278, 11579–11589, (2003)
- [61] Lind S. B., Molin M., Savitski M. M., Emilsson L. A., Ström J., Hedberg L., Adams C., Nielsen M. L., Engström A., Elfneh L., Andersson E., Zubarev R. A., Pettersson U.: *J. Proteome Res.*, 7, 2897–2910, (2008)
- [62] Rush J., Moritz A., Lee K. A., Guo A., Goss V. L., Spek E. J., Zhang H., Zha X. M., Polakiewicz R. D., Comb M. J.: *Nat. Biotechnol.*, 23, 94–101, (2005)
- [63] Ville'n J., Beausoleil S. A., Gerber S. A., Gygi S. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 1488–1493, (2007)
- [64] Zhang G. A., Neubert T. A.: *Proteomics*, 6, 571–578, (2006)
- [65] Schmidt S. R., Schweikart F., Andersson M. E.: *J. Chromatogr. B*, 849, 154–162 (2007)
- [66] Hefetz D., Fridkin M., Zick Y.: *Eur. J. Biochem.*, 182, 343–348 (1989)
- [67] Condina M. R., Guthridge M. A., McColl S. R., Hoffmann P.: *Proteomics*, 9, 3047–3057, (2009)
- [68] Brumbaugh K., Johnson W., Liao W. CH., Lin M. S., Houchins J. P., Cooper J., Stoez S., Gonzalez R. C.: *Methods Mol. Biol.*, 717, 3–43, (2001)
- [69] Ross A. H., Baltimore D., Eisen H. N.: *Nature*, 294, 654–656, (1981)
- [70] Glenney J. R. Jr., Zokas L., Kamps M. P.: *J. Immunol. Methods*, 109, 277–285, (1988)
- [71] Wang J. Y.: *Methods Enzymol.*, 201, 53–65, (1991)
- [72] Kanakura Y., Druker B., Cannistra S. A., Furukawa Y., Torimoto Y., Griffin J. D.: *Blood*, 76, 706–715, (1990)
- [73] Briand J. P., Muller S. Van Regenmortel, M. H. V.: *J. Immunol. Methods*, 78, 59–69, (1985)
- [74] Epstein R. J., Druker B. J., Roberts T. M., and Stiles C. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10435–10439, (1992)
- [75] Levine L., Gjika H. B., Van Vunakis H. J.: *Immunol. Methods*, 124, 239–49, (1989)

- [76] Swerdlow R. D., Ebert R. F., Lee P., Bonaventura C., Miller K. I.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 113, 537-548, (1996)
- [77] Frackelton R. A., Posner M., Kannan B., Mermelstein F.: *Methods Enzymol.*, 201, 79– 92, (1991)
- [78] Leslie G. A., Clem L. W.: *J. Exp. Med.*, 130, 1337-1352, (1969)
- [79] Narat M.: *Food Technol. Biotechnol.*, 41, 259-267, (2003)
- [80] Hodek P., Stiborová M.: *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.*, 4, 461-468, (2003)
- [81] Hořejší V., Bartůňková J.: *Základy imunologie*, Triton, Praha (2005)
- [82] Reynaud C. A., Dahan A., Anquez V., Weill J. C.: *Cell*, 40, 283-291 (1985)
- [83] Sharma J. M.: *Acta Vet. Hung.*, 45, 229, (1997)
- [84] Polson A., von Wechmar M. B., van Regenmortel M. H. V.: *Immunol. Commun.*, 9, 475-493, (1980)
- [85] Polson. A., Coetzer T., Kruger J., von Maltzahn E., van der Merwe K. J.: *Immunol. Invest.*, 14, 323-327, (1985)
- [86] Hernández-Campos F. J., Brito-De la Fuente E., Torrestiana-Sanchez B.: *J. Agric. Food Chem.*, 58, 187–193, (2010)
- [87] Verdoliva A., Basile G., Fassina G.: *J. Chromatogr. B*, 749, 233–242, (2000)
- [88] Al-Haddad S., Zhang Z., Leygue E., Snell L., Huang A., Niu Y., Hiller-Hitchcock T., Hole K., Murphy L.C.: *Am. J. Pathol.*, 155, 2057-2066 (1999)
- [89] Lemamy G. J., Roger P., Mani J.C., Robert M., Rochefort H. Brouillet J. P.: *Int. J. Cancer*, 80, 896-902 (1999)
- [90] Noack F., Helmecke D., Rosenberg R., Thorban S., Nekarda H., Fink U., Lewald J., Stich M., Schutze K., Harbeck N., Magdolen V., Graeff H., Schmitt M.: *Int. J. Oncol.*, 15, 617-23, (1999)
- [91] Thalley B.S., Carroll S.B.: *Biotechnology (NY)*, 8, 934-938, (1990)
- [92] <http://www.bostonexpresslab.biz/gallery1.htm> [4. 4. 2012]
- [93] <http://www.proteinmods.com/services/antibody-production-services/> [3. 4. 2012]
- [94] <http://www.aveslab.com/services/> [3. 4. 2012]
- [95] <http://www.creative-biolabs.com/antibodyproduction4.htm> [4. 4. 2012]
- [96] Emmerová T.: *Nové typy magnetických sorbentů pro analýzu fosfoproteinů*, Diplomová práce, PřF UK, katedra biochemie, (2011)



- [97] Li S. H., Dass C.: *Anal Biochem.*, 270, 9–14, (1999)
- [98] <http://www.uniprot.org/> [5. 8. 2011]
- [99] Imanishi S. Y., Kochin V., Ferraris S. E., de Thonel A., Pallari H. M., Corthals G. L., Eriksson J. E.: *Mol. Cell Proteomics*, 6, 1380-1391 (2007)
- [100] Mercier J., Grosclaude F., Ribadeau-Dumas B.: *Eur. J. Biochem.*, 23, 41-51, (1971)
- [101] Shainkin, R., Perlmann G. E.: *J. Biol.Chem.*, 246, 2278-2284, (1971)
- [102] Nisbet, A.D., Saundry R. H., Moir A. J., Fothergill L. A., Fothergill E. J.: *Eur. J. Biochem.*, 115, 335-345, (1981)
- [103] Kurono Y., Kushida I., Tanaka H., Ikeda K.: *Chem. Pharm. Bull.*, 40, 2169–72, (1992)
- [104] Watanabe H., Tanase S., Nakajou K., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Otagiri M.: *Biochem. J.*, 349, 813–9, (2000)
- [105] Sakurai Y., Ma S. F., Watanabe H., Yamaotsu N., Hirono S., Kurono Y.: *Pharm. Res.*, 21, 285–92, (2004)
- [106] Sogorb M. A., Díaz-Alejo N., Escudero M. A., Vilanova E.: *Arch. Toxicol.*, 72, 219-26, (1998)
- [107] Sogorb M. A., Monroy A., Vilanova E.: *Chem. Res. Toxicol.*, 11, 1441-1446, (1998)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli

[illegible]